

# Desarrollo de un nuevo método espectrofluorimétrico para la determinación de aluminio en moluscos



**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Doble grado en Ciencias**

**Ambientales y Ciencias Químicas**

**Autor:**

**Carlos Borrego Corchado**

**Tutores:**

**Estrella Espada Bellido**

**José Antonio López López**

**Universidad de Cádiz**

**Curso 2015-2016**



**Desarrollo de un nuevo método espectrofluorimétrico para la  
determinación de aluminio en moluscos**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

realizado en la

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES**

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**

Memoria del Trabajo de Fin de Grado presentado por el alumno Carlos Borrego Corchado, para optar al título de Doble Grado en Ciencias Ambientales y Ciencias Químicas

Puerto Real, a 16 de Septiembre de 2016

Fdo. Carlos Borrego Corchado



## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años he recibido la ayuda de muchas personas a las que me gustaría dedicarles mi agradecimiento por su apoyo tanto a nivel personal como académico.

En primer lugar, agradecer a mis tutores del proyecto, Dr. Don José Antonio López López por el esfuerzo realizado y su atención en todo momento y a Dra. Doña Estrella Espada Bellido que desde que entré a colaborar con ella, sólo tengo palabras de agradecimiento, por sus consejos, por su constante ayuda, por su forma de ser, de enseñarte, transmitiendo su ilusión y su confianza en mí a lo largo de estos 4 años en los que he aprendido muchas cosas.

Dicen que la etapa universitaria es una de las mejores etapas de la vida, tengo que decir que quién dijo esto no se equivocaba, he tenido la suerte, aunque todo tiene su esfuerzo, de realizar un doble grado que me ha permitido conocer a muchas personas, de las cuáles algunas son verdaderos amigos con los que he compartido una gran cantidad de momentos inolvidables y con los que tras años de amistad, puedo decir con seguridad que son AMIGOS de verdad.

También quería agradecer a todos los compañeros con los que he dado clase, por haber sido partícipes de una de las etapas más maravillosas de mi vida.

Por último, agradecer a las personas a las que debo todo, mi familia. Mis abuelos por su apoyo, pero especialmente a mis padres y a mi hermana Marina. Mis padres los cuales se han sacrificado enormemente para verme crecer como persona y proporcionarme un futuro, así como a mi hermana la cual siempre ha sido ese pilar rígido de madurez y la que he tomado como modelo a seguir.

Muchas gracias a todos.



## Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. Metales en el medio ambiente.....	3
1.2. Aluminio en el medio ambiente .....	4
1.3. Aluminio y salud humana .....	5
1.4. Acumulación de metales en moluscos.....	6
1.5. Fluorescencia.....	7
1.6. Picolinoilhidrazona del Salicilaldehído (SAPH) .....	9
1.7. Optimización multivariante.....	10
1.8. Validación de métodos analíticos.....	11
1.8.1. Cálculo de la Incertidumbre .....	13
2. OBJETIVOS .....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	15
3.1. Protocolo de limpieza.....	15
3.2. Síntesis de SAPH .....	15
3.2.1. Síntesis de la Picolinoilhidracida (PH).....	15
3.2.2. Síntesis de la SAPH.....	16
3.3. Procedimiento de preparación de muestras .....	17
3.4. Equipos.....	18
3.5. Material biológico .....	19
3.6. Zona de estudio .....	20
3.7. Diseño de experimentos-Box-Behnken (DBB) .....	22
3.8. Validación del método y cálculo de la incertidumbre combinada .....	23
3.8.1. Cálculo de la incertidumbre combinada.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. Estudios preliminares .....	27
4.1.1. Determinación de los espectros de excitación y emisión y de la estequiometría del complejo Al(III)-SAPH.....	27
4.2. Estudios Univariantes.....	28
4.2.1. Influencia de la disolución reguladora .....	28
4.2.2. Influencia del reactivo SAPH.....	29
4.2.3. Influencia del porcentaje de etanol.....	30
4.2.4. Influencia del pH.....	31

---

4.3.	Optimización del método espectrofluorimétrico mediante el diseño de experimentos Box-Behnken.....	32
4.4.	Validación del método propuesto siguiendo las especificaciones de la norma ISO 17025.....	40
4.4.1.	Confirmación de identidad .....	40
4.4.2.	Selectividad y especificidad .....	41
4.4.3.	Intervalos lineal y de trabajo .....	42
4.4.4.	Exactitud.....	43
4.4.5.	Límite de Detección y Cuantificación.....	45
4.4.6.	Sensibilidad .....	46
4.4.7.	Robustez .....	46
4.4.8.	Análisis de recuperación .....	47
4.4.9.	Incertidumbre .....	47
4.5.	Aplicación a muestras de <i>Callista Chione</i> .....	53
4.6.	Comparación del método propuesto para la determinación de aluminio en moluscos con otros métodos encontrados en la bibliografía .....	56
5.	CONCLUSIONES .....	57
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	58
7.	ANEXOS.....	64
7.1.	Anexo 1 .....	64
7.2.	Anexo 2 .....	65
7.3.	Anexo 3 .....	66
7.4.	Anexo 4 .....	68



## RESUMEN

La contaminación metálica en los diferentes compartimentos medioambientales conlleva efectos tóxicos en la biota marina si los metales se encuentran en concentraciones elevadas. Un ecosistema marino con altas concentraciones metálicas puede llegar a ser un riesgo para la salud debido a la posible incorporación de estos contaminantes a la cadena alimentaria. Los moluscos han sido ampliamente utilizados para controlar el contenido metálico en los diferentes compartimentos medioambientales debido a su distribución universal, abundancia y habilidad para acumular metales.

El aluminio es el tercer elemento más común encontrado en la corteza terrestre, sólo por detrás del oxígeno y el silicio. Además, este metal es el más empleado en envases y embalajes. Actualmente, su estudio es de gran interés ya que en altas concentraciones parece estar implicado en casos de enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y diabetes. La picolinoilhidrazona del salicilaldehído (SAPH) es un reactivo con una alta capacidad complejante, que se ha empleado anteriormente de manera satisfactoria para la determinación de aluminio en suelos y agua de mar, presentando un aumento de fluorescencia en presencia de este metal a pH ligeramente ácidos. El Al y SAPH forman un complejo fluorescente de color azul-verdoso con una relación estequiométrica 1 Al: 3 SAPH.

En este trabajo, se ha desarrollado un nuevo método espectrofluorimétrico empleando SAPH para la determinación del aluminio presente en organismos como los moluscos bivalvos.

En primer lugar, se han realizado una serie de estudios previos para conocer el comportamiento de cada una de las variables que afectan al sistema. A continuación, se ha llevado a cabo la optimización de las variables (pH, concentración de reguladora, concentración de SAPH y % de etanol) mediante un diseño Box-Behnken, realizando un total de 27 experimentos con tres puntos centrales. Bajo las condiciones óptimas encontradas (pH 6,64; 0,9 M de reguladora; 3 mM de SAPH y 50% de etanol) se obtuvieron unos límites de detección y cuantificación adecuados para el análisis de aluminio en muestras reales, LOD de  $2,72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y LOQ de  $9,06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Se ha podido observar como la respuesta espectrofluorimétrica crece linealmente con la concentración de metal hasta  $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Al.

Para la validación del nuevo método espectrofluorimétrico, se han seguido las especificaciones de la norma ISO 17025. Finalmente, el método se ha aplicado de manera satisfactoria para la determinación de aluminio en una especie de molusco del litoral marroquí.

## ABSTRACT

Metal contamination in the different environmental compartments involves toxic effects on marine biota if metals are found in high concentrations. A marine ecosystem with high metal concentrations can lead to a health risk due to the possible incorporation of these pollutants into the food chain. Molluscs have been widely used to control the metal content in the different environmental compartments due to their universal distribution, abundance and ability to accumulate metals.

Aluminium is the third most common element found in the crust of the earth, only exceeded by oxygen and silicon. Besides, this metal is the most used in containers and packaging. Currently, its study is of great interest because in high concentrations seems to be involved in cases of diseases such as Alzheimer's, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis and diabetes. The salicylaldehyde picolinoylhydrazone (SAPH) is a reagent with a high complexing capacity that has been used previously for the aluminium determination in soils and sea water, presenting an increase of fluorescence in the presence of this metal to slightly acidic pH. The Al and SAPH form a fluorescent blue-green colour complex with a stoichiometric relation 1 Al: 3 SAPH.

In this work, a new spectrofluorimetric method has been developed using SAPH for the determination of aluminium present in organism such as bivalve molluscs.

First, a preliminary study has been carried out to understand the behaviour of each of the variables that affect the system. Then, the optimization of the variables (pH, concentration of buffer, concentration of SAPH and % ethanol) has been carried out through a Box-Behnken design, making a total of 27 experiments with three central points. Under optimum conditions found (pH 6.64; 0.9 M of buffer; 3 mM SAPH and 50% ethanol) detection and quantification limits suitable for analysis of aluminum in real samples: LOD  $2,72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and of LOQ  $9,06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , were obtained. It has been observed that the spectrofluorimetric response grows linearly with the concentration of metal up to  $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of Al.

The method was validated following ISO 17025 recommendations. Finally, the new spectrofluorimetric method has been satisfactorily applied to the determination of aluminium in a species of mollusc from the Moroccan coast.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Metales en el medio ambiente

Los elementos metálicos, por lo general, son relativamente poco abundantes en los sistemas ambientales, siendo los más frecuentes en la naturaleza los pertenecientes a los primeros períodos de cada grupo. La presencia de los mismos en los diferentes compartimentos medioambientales: litosfera, hidrosfera, atmósfera y biosfera, se debe a causas de origen natural y causas de origen antropogénico [1]. Las fuentes de origen natural dependen de la composición de la roca madre originaria y de los procesos erosivos sufridos por los materiales que conforman la misma, mientras que las de origen antropogénico se deben principalmente a la intervención humana en el ciclo biogeoquímico de los metales pesados [2]. Su distribución por los diferentes compartimentos es debida a las interacciones de energía y de materia que se producen entre las esferas, gracias a lo cual, estos metales pueden liberarse, transportarse y recombinarse de manera natural [3].

Los elementos metálicos pueden clasificarse de una manera muy simple como metales traza esenciales y metales traza no esenciales. La IUPAC define como metales traza, a aquellos cuya concentración es menor al 0,01 % ( $100 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ). Los metales esenciales son aquellos necesarios para la vida a bajas concentraciones y cuya ausencia, puede provocar alguna deficiencia [4], tales como Mn, Cu y Zn esenciales para plantas y animales [1]. Mientras que los no esenciales, son aquellos que provocan efectos tóxicos cuando sus concentraciones superan el límite de tolerancia del organismo y su ausencia no provoca ninguna deficiencia [5]. Dentro de este grupo podemos incluir los siguientes metales: Al, As, Cd, Hg, Pb y U, entre otros.

Su alto grado de persistencia en el medio, su tendencia a la bioacumulación en la cadena trófica y, en ciertos casos, su elevada toxicidad incluso a bajas concentraciones, hacen que los metales sean considerados uno de los contaminantes ambientales más peligrosos y por lo tanto, un riesgo importante para los seres vivos. Éstos además, pueden transformarse en otras sustancias más tóxicas que las iniciales, siendo por lo general más solubles en estados más oxidados y en ambientes con pH ácidos [5].

La acumulación más alta de metales en el medio natural tiene lugar en los sedimentos [6], siendo éstos el hábitat de una amplia gama de organismos que intervienen en la cadena trófica. Por esta razón, la concentración de metales en los sedimentos puede representar un peligro potencial para la salud humana [7].

## 1.2. Aluminio en el medio ambiente

El aluminio es el tercer elemento más común encontrado en la corteza terrestre, sólo por detrás del oxígeno y el silicio [8,9]. A pesar de ser uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, el aluminio no se encuentra como tal en la naturaleza, sino formando parte de aluminosilicatos presentes en numerosas rocas, de donde se extrae para su posterior uso [10,11]. En el medio acuático en concreto, puede presentarse en forma de catión o anión, en función de la concentración de otras especies aniónicas o catiónicas, de la materia orgánica y del tipo de minerales del medio, que favorecen la presencia del aluminio en uno de sus diferentes estados de oxidación [11]. Generalmente, se encuentra como ion  $\text{Al}^{3+}$ , siendo su presencia, en ocasiones, muy superior a la de otros cationes biológicamente importantes como pueden ser  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , llegando incluso a ser tóxico a altas concentraciones [12].

Además, este metal, gracias a sus propiedades físicas y químicas tales como, baja densidad, maleabilidad, ductilidad, baja resistencia mecánica, poca tendencia a la oxidación en presencia de oxígeno, resistente a la corrosión y conductor de la corriente eléctrica [13], presenta un extendido uso en una gran variedad de productos, siendo el más empleado en envases y embalajes.

Como consecuencia de su amplio uso antropogénico, está muy extendido en los distintos compartimentos ambientales, haciendo más fácil su solubilidad en el medio, además de su biodisponibilidad [9].

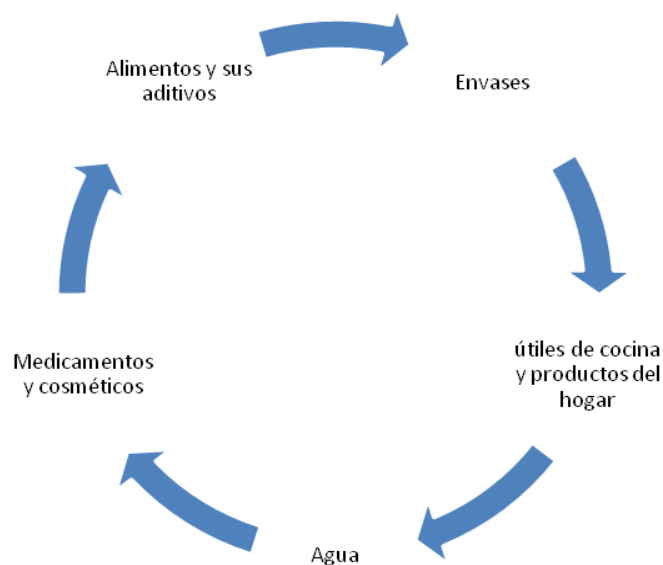
Las principales fuentes antropogénicas de contaminación de aluminio son:

- La minería y la producción de aluminio metálico, aleaciones y otros productos que generan altas cantidades de aluminio en el ambiente.
- Plantas de energía que utilizan carbón como combustible e incineradores, liberando de esta forma pequeñas cantidades de aluminio al medio.
- En menor medida, pero no por ello menos importante, los residuos de aluminio (utensilios de cocina, marcos de ventanas, envases y latas, entre otros) mal gestionados, que quedan en el ambiente con su posterior degradación en el medio, hacia formas tóxicas para la salud [14].

Todas estas fuentes de contaminación tienen especial influencia en la salud humana, ya sea directa, o indirectamente a través de la cadena trófica.

### 1.3. Aluminio y salud humana

La gran utilización del aluminio en la vida diaria hace fácil su exposición, a través de los alimentos y sus aditivos, envases, útiles de cocina y productos del hogar, medicamentos y cosméticos y agua (Figura 1) [15].



**Figura 1. Fuentes de exposición al aluminio.**

Aunque, el efecto tóxico del aluminio en el organismo no se conoce con certeza, estudios realizados recientemente en diferentes individuos expuestos a altas concentraciones del mismo, indican que éste puede provocar cambios en el comportamiento, déficit de aprendizaje y neuropatologías, así como daños neuroquímicos y genotóxicos [16–18], siendo de especial interés su implicación en casos de enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y diabetes, siempre que se encuentre en altas concentraciones [19].

Por esta razón, el estudio de la relación del aluminio con ciertas enfermedades es objeto de numerosas investigaciones en la actualidad [20,21]. Estudios recientes en ratas han demostrado que los grupos citrato y glutamato permiten la absorción del aluminio en el intestino y aumentan su deposición en los glóbulos rojos, el cerebro y el riñón [22].

Otras investigaciones también realizadas en animales, señalan que el tratamiento crónico con citrato de aluminio aumenta la vulnerabilidad de las células al estrés oxidativo [23]. Por otra parte, los iones fosfatos y carboxilatos, entre otros, presentan una alta afinidad hacia el  $\text{Al}^{3+}$ .

El  $\text{Al}^{3+}$  es una especie catiónica con fuerte carga y con un radio iónico similar al de otros cationes presentes en el cuerpo humano, que resultan esenciales para el desarrollo de nuestra

vida como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , de manera que su ingesta puede provocar su entrada al organismo, incorporándose a las enzimas y proteínas en su sitio de unión, modificando así el metabolismo celular de las mismas, afectando como consecuencia a todo el funcionamiento del organismo [24,25].

#### 1.4. Acumulación de metales en moluscos

Los moluscos son el grupo de animales más diverso después de los artrópodos, son invertebrados y presentan una gran variedad morfológica, su cuerpo es blando, normalmente protegido por una concha y dividido en tres partes, la cabeza, donde se encuentra la boca, el pie que les proporciona la capacidad de desplazarse, y el manto, siendo este un órgano de origen ectodérmico cuyas células secretan carbonato cálcico que originan la concha y lo protegen del exterior [26].

Existen numerosos tipos de moluscos: Gasterópodos, cefalópodos, bivalvos, siendo estos últimos a los que pertenecen las almejas, mejillones o berberechos.

Dentro de los moluscos bivalvos, éstos pueden ser marinos o de agua dulce, incluyendo filtradores, excavadores y organismos que viven adheridos al sustrato, como las almejas, que mediante el movimiento de los cilios (pequeños filamentos branquiales), filtran el agua siguiendo una trayectoria que proporciona el oxígeno y las partículas alimenticias a las branquias, para luego evacuar a través de la cavidad paleal en la zona donde está la apertura renal. Este proceso hace que puedan permanecer enterradas de 15 a 30 cm bajo el lecho marino y soportar las fuertes bajamares [26].

La utilización de moluscos para determinar la contaminación metálica en zonas costeras, está ampliamente extendida [27–33]. El uso de éstos para tal fin se debe principalmente a que su distribución geográfica es muy amplia, son fáciles de recolectar, presentan gran habilidad para acumular metales, además de ser resistentes a altas concentraciones de los mismos [34].

En el caso de los bivalvos marinos se han realizado estudios sobre su capacidad para acumular metales de transición, y los niveles de acumulación en sus tejidos son considerados como un reflejo de los componentes biodisponibles de metales en sistemas acuáticos [35]. Además, estas especies son particularmente útiles debido a que en sus tejidos se acumulan metales trazas en concentraciones de varios órdenes de magnitud superiores a los de su entorno ambiental y toleran un amplio rango de condiciones medioambientales [36]. Lo que puede suponer un riesgo para la salud humana en aquellas especies que se consuman en la dieta.

De esta manera se hace necesario definir de manera breve qué se entiende por biodisponibilidad y bioacumulación.

Se denomina **biodisponibilidad** al grado de absorción y accesibilidad de los metales pesados hacia los organismos vivos. La biodisponibilidad de los metales hacia los organismos está determinada por factores fisicoquímicos y factores propios de los organismos [37].

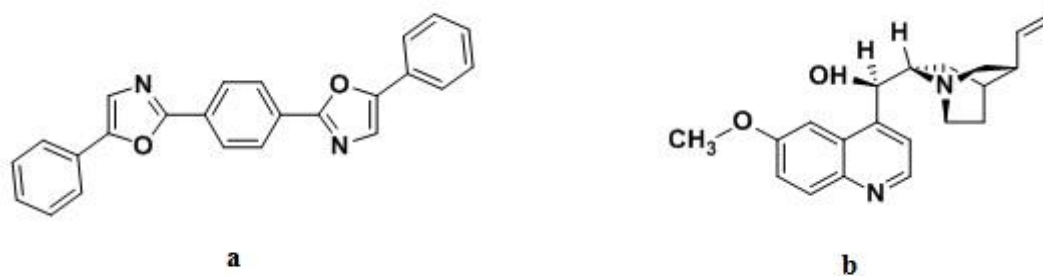
Mientras que se entiende por **bioacumulación** al proceso que implica el aumento progresivo de la cantidad de sustancia en los tejidos de un organismo como consecuencia de que la velocidad de absorción supera la capacidad del organismo para eliminar dicha sustancia. El grado de acumulación depende de factores tales como la naturaleza química del contaminante, el tipo de organismo, su estado fisiológico, la temperatura del agua y la salinidad [38].

A pesar de la importancia de los moluscos para acumular metales y su implicación con la salud humana, debido a su consumo, son muy pocos los métodos desarrollados en la bibliografía para determinar aluminio en este tipo de muestras.

### 1.5. Fluorescencia

Las principales técnicas analíticas empleadas para la determinación de aluminio a nivel de trazas son la activación de neutrones, la espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), entre otras. Todas estas técnicas proporcionan límites de detección bajos, bajas interferencias químicas, sin embargo, no son fácilmente accesibles para todos los laboratorios [39]. Por ello es interesante el empleo de otras técnicas más económicas y que proporcionen un análisis cuantitativo de similares características, como es el caso de la espectroscopía de fluorescencia.

Para que una molécula o complejo emita fluorescencia debe presentar una estructura concreta, como hidrocarburos poliaromáticos y heterociclos, las cuales reciben el nombre de fluoróforos que absorben radiación de una determinada longitud de onda y emiten radiación a otra longitud de onda más larga, dando lugar a transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$  [40]. Por esta razón, la fluorescencia es una técnica muy selectiva, ya que sólo una minoría de las moléculas presentan estructuras susceptibles de dar fluorescencia, destacando la quinina y la 1,4-bis(5-feniloxazol-2-il)benceno (POPOP) (Figura 2):



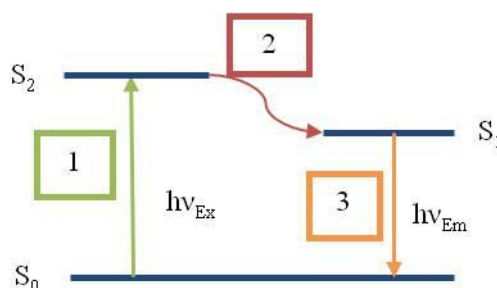
**Figura 2. Ejemplos de moléculas fluorescentes: a) POPOP y b) Quinina**

El proceso de fluorescencia se divide en tres etapas fundamentales (Figura 3):

1. Absorción y excitación: a temperatura ambiente, las moléculas se encuentran en el nivel vibracional más bajo dentro del estado electrónico fundamental ( $S_0$ ). Cuando absorben un fotón, la molécula se excita hacia un determinado nivel energético dentro del estado excitado singlete ( $S_2$ ).

2. Relajación vibracional y conversión interna: Después de la absorción de un fotón, lo más probable es que tenga lugar una relajación entre los niveles de energía vibracionales dentro del primer nivel excitado ( $S_2$ ). Esta relajación tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente, aumentando la temperatura del mismo. Este proceso tiene lugar en pico-segundos o menos. La conversión interna son procesos intermoleculares por los cuales la molécula pasa a un estado electrónico excitado de más baja energía ( $S_1$ ) sin emisión de radiación [40].

3. Emisión: La molécula permanece en el estado excitado más bajo singlete ( $S_1$ ) unos nano-segundos. Desde este nivel vibracional del estado  $S_1$ , la molécula vuelve a cualquier nivel vibracional del estado fundamental ( $S_0$ ), emitiendo un fotón de energía en forma de fluorescencia [40,41].



**Figura 3. Etapas en un proceso de fluorescencia obtenida del diagrama de Jablonski:**

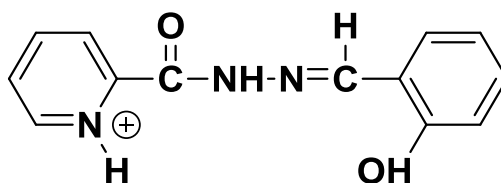
**1) Absorción; 2) Conversión interna; 3) Fluorescencia [41].**



En numerosas ocasiones, la intensidad de fluorescencia de una determinada muestra se ve atenuada como consecuencia de las interacciones moleculares, tales como, reacciones en estado excitado, reorganizaciones moleculares, procesos de transferencia de energía, formación de complejos en estado fundamental y atenuación colisional [41]. A este fenómeno de atenuación se le conoce como “quenching”.

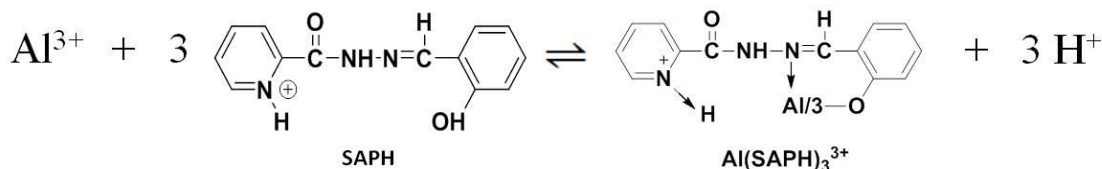
#### 1.6. Picolinoilhidrazona del Salicilaldehído (SAPH)

Para la optimización de este nuevo método espectrofluorimétrico, se va a emplear como reactivo la picolinoilhidrazona del salicilaldehído (SAPH) (Figura 4), reactivo complejante, que junto con el aluminio forma un complejo fluorescente azul-verdoso con una relación estequiométrica 1 Al: 3 SAPH.



**Figura 4. Picolinoilhidrazona del Salicilaldehído (SAPH)**

La intensidad de fluorescencia aumenta en presencia de este metal a pH ligeramente ácidos. La reacción que tiene lugar es la siguiente (Figura 5) [10]:

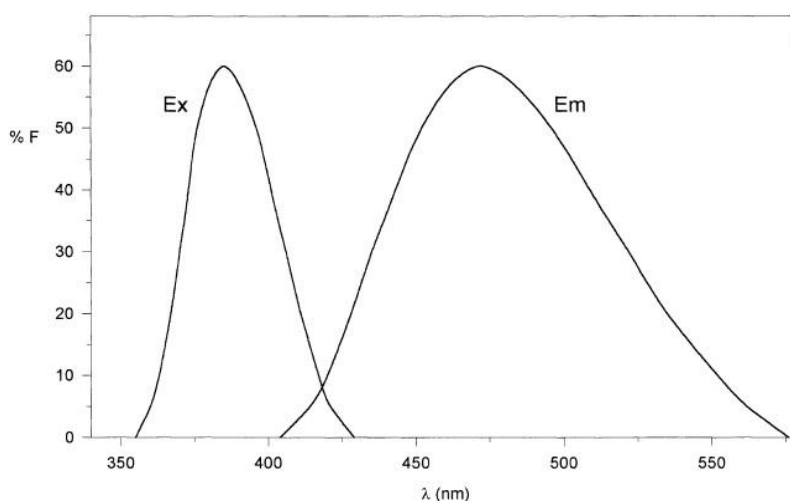


**Figura 5. Formación del complejo Al(III)-SAPH**

Este reactivo no es soluble en agua de manera que a la hora de preparar las disoluciones es necesario la utilización de N,N-dimetilformamida DMF o etanol para disolverlo [42], siendo el etanol el disolvente más empleado para su disolución.

Este reactivo ha sido previamente empleado de manera satisfactoria para la determinación de aluminio en suelos [10], agua de mar [43], disoluciones de diálisis concentradas [44] y agua de consumo [45]. En todos estos casos, como se puede observar en la figura 6, las longitudes de onda empleadas fueron,  $\lambda_{\text{ex}}=384$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=468$  nm, siendo el pH de la muestra 5,4 y al 24 % de etanol. Una vez preparadas las muestras se procedía a medir directamente en el

espectrofluorímetro. En todos los casos, se pudieron observar resultados comparables al de otras técnicas, como ICP-AES, ICP-MS y GF-AAS.



**Figura 6. Espectro de excitación y emisión del complejo Al-SAPH [43].**

### 1.7. Optimización multivariante

Un diseño de experimentos puede definirse como una metodología matemática y estadística que permite una planificación de las secuencias de experimentos a realizar de forma óptima, minimizándose tanto el coste de la experimentación como la influencia del error experimental [46]. En un diseño de experimentos, existen dos tipos de variables: las respuestas y los factores. Las respuestas son las variables dependientes y sus valores dependen de los niveles de los factores, que pueden ser clasificados como cuantitativos o cualitativos [47]. Un factor se define, como una variable experimental que puede afectar al resultado, denominándose niveles a todos los posibles valores que pueda tomar dicho factor [48].

Por regla general, existen diferencias entre los resultados que proporcionan los análisis univariantes, en los que se estudia el efecto que tiene sobre la respuesta un único factor, y los análisis multivariantes, en los que se puede modificar los niveles de varios factores al mismo tiempo. Esto ofrece como ventaja conocer la interacción que existen entre los mismos y su posible efecto conjunto sobre la respuesta [48].

Un diseño de experimentos ampliamente utilizado es el diseño de Box-Behnken que es un tipo de diseño de superficie de respuesta que no tiene un diseño factorial o factorial fraccionado incrustado [46]. Este tipo de diseño presenta numerosas ventajas sobre otros diseños factoriales. La superficie de respuesta genera un modelo matemático que se ajusta a las respuestas experimentales a partir del cual se pueden calcular las condiciones óptimas del método. Permiten una estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden, además de

reducir el número de experimentos necesarios a realizar. Por otro lado, al no poseer puntos axiales, se tiene la seguridad de que todos los puntos del diseño se encuentran dentro de la zona de operación segura.

### 1.8. Validación de métodos analíticos

Se entiende como validación de un método analítico, el proceso de adecuación y evaluación del mismo para resolver un problema determinado. Por tanto, un método validado debe cumplir una serie de requisitos que garanticen su consistencia y la de los resultados obtenidos. La determinación de una sustancia en una muestra consiste en medir su concentración. Para asegurar la corrección de las medidas es necesario recurrir a la Metrología, que etimológicamente se entiende como "la ciencia de la medida" [49].

La validación de un método está relacionada con su desarrollo y en muchas ocasiones ambos coinciden en varios puntos, por lo que no hay una clara definición sobre cuándo termina el desarrollo del método (que ocurre en primer lugar) y comienza el proceso de validación, ya que algunos de los factores utilizados durante el desarrollo son empleados para llevar a cabo la validación [50].

Mediante la validación del método se establece si los parámetros de calidad satisfacen los requisitos de una aplicación analítica concreta. Para ello, se requiere experimentación y comparación con valores de referencia bien conocidos, siendo el objetivo garantizar la comparabilidad de las medidas realizadas sobre una muestra con otras diferentes en cualquier lugar del mundo [51].

En este trabajo el problema planteado es la determinación de Al en muestras de digeridos de moluscos, habiéndose seleccionado como método analítico la espectrofluorimetría.

Por ello, en este momento es conveniente introducir el concepto de mensurando, referido al agente químico que se va a determinar teniendo en cuenta su entorno y las operaciones previas a la aplicación del método [52]. Este concepto engloba a su vez al tradicional analito, que hace referencia únicamente al agente químico a determinar. Así, en el caso que nos ocupa, el analito es el metal a determinar, aluminio, mientras que el mensurando es la concentración del metal en una muestra digerida de molusco. De esta forma el problema analítico queda perfectamente definido.

Los parámetros a determinar durante la validación son:

- Confirmación de la identidad: La confirmación de la identidad trata de asegurar que la señal producida durante la etapa de medida corresponde al mensurando y no a otra especie

química o física de similares propiedades que pueda ofrecer una señal que coincida con la de éste. Una forma de realizarla es utilizando varias técnicas para llevar a cabo la determinación del mensurando y comparar los resultados obtenidos [53].

- **Selectividad y especificidad:** Son dos parámetros que se encuentran muy ligados entre sí y con la identidad del analito. Ambos dan una idea de la capacidad del método para asegurar que se está evaluando el analito de interés en presencia de una matriz con otros componentes. De este modo, cuanto más selectivo es un método, menos se verá afectado por la presencia de interferencias y mayor confianza generarán los resultados.

- **Intervalos lineal y de trabajo:** Para cuantificar un analito siempre es necesario definir el intervalo de concentración o respuesta en el que se realizan las medidas analíticas, por tanto, se deben definir los límites superior e inferior entre los que se puede aplicar el método en cuestión. El límite inferior viene dado por el límite de cuantificación, mientras que el límite superior viene dado por el límite de linealidad, que depende de la capacidad de respuesta del método.

- **Exactitud:** La exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre los valores obtenidos por dicho método con los valores de referencia o bien con valores obtenidos por un método de referencia adecuado.

En este caso en concreto, se va a tener en cuenta la diferencia del valor determinado con el de referencia, sesgo, además de la precisión de las medidas realizadas, englobando los factores aleatorios como sistemáticos que les puedan afectar [49]. No se puede hablar de exactitud sin incluir antes sesgo y precisión.

- **Límite de detección y cuantificación:** Cuando se realiza la medida del mensurando o de una de sus propiedades a bajos niveles, es importante establecer cuál es el límite inferior de esta propiedad a la que se puede obtener un resultado en el que se puede confiar [49].

El límite de detección se define como la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada en una muestra, aunque no sea posible determinarla exactamente a ese nivel de concentración [51].

El límite de cuantificación se define como el nivel de concentración que puede ser determinado de forma exacta y precisa bajo las condiciones operacionales normales [51].

- **Sensibilidad:** La sensibilidad analítica es el cambio de respuesta que corresponde a un cambio pequeño en la cantidad medida de concentración de analito (análisis cuantitativo) [53].

- **Robustez:** Es la inercia que presenta un método analítico a modificar su señal cuando tienen lugar pequeños cambios en las condiciones ambientales u operativas, que se consideran

las variables que gobiernan el experimento de medida. Para el estudio de robustez, estas condiciones se modifican ligeramente, siguiendo un determinado diseño experimental, y se comprueba su influencia en la señal analítica. De esta forma es posible detectar las etapas críticas del método y controlarlas durante la aplicación para obtener resultados fiables.

- **Análisis de recuperación:** Por análisis de recuperación se entiende la respuesta del detector ante una adición o extracción de analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero [54].

### 1.8.1. Cálculo de la Incertidumbre

La incertidumbre se define según el diccionario de Vocabulario Internacional de términos básicos y generales en Metrología (VIM), como un parámetro asociado al resultado que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos de forma razonable al mensurando [52]. Cualquier medición que hagamos entrañará un cierto grado de incertidumbre, por lo que el intervalo de incertidumbre que se fije será el rango dentro del cual se situará el valor real con un determinado grado de confianza. Normalmente se utiliza un grado de confianza del 95% [55]. Entender qué significa la incertidumbre es fundamental para interpretar los resultados e informar sobre ellos [56].

Hay que tener en cuenta que la palabra incertidumbre no expresa duda sobre la validez de las medidas realizadas, sino que proporciona una mayor confianza en los resultados ofrecidos [57]. La práctica más habitual es determinar la incertidumbre estándar correspondiente a cada etapa del método y luego combinarlas mediante la ley de propagación de la incertidumbre (Ecuación 1), para dar lugar a la incertidumbre combinada:

$$u_c^2 = u_{s1}^2 + u_{s2}^2 + \dots + u_{sk}^2$$

#### **Ecuación 1. Ley de propagación de la incertidumbre.**

Conocida la incertidumbre combinada a partir de la ecuación 1, se puede calcular la incertidumbre expandida,  $U$ , multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura que permita establecer un intervalo de concentraciones en el que se encuentre de forma razonable el mensurando. Para un nivel de confianza del 95 %, el factor de cobertura,  $k$ , es igual a 2, quedando la incertidumbre expandida según la ecuación 2:

$$U = u_c \cdot 2$$

#### **Ecuación 2. Cálculo de la incertidumbre expandida.**

## 2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es el desarrollo de un nuevo método espectrofluorimétrico para la cuantificación de aluminio en moluscos.

Para la consecución de dicho objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Optimización de la determinación espectrofluorimétrica de Al con SAPH en muestras de digeridos de moluscos.
- Validación del método desarrollado siguiendo las especificaciones de ISO 17025.
- Estudio de la concentración de Al en muestras de moluscos de la especie *Callista chione* procedentes del litoral marroquí utilizando el método desarrollado.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Protocolo de limpieza

Esta parte del trabajo fin de grado es de gran importancia, ya que al tratarse de un estudio para la determinación de aluminio a bajas concentraciones cualquier error durante la manipulación de las muestras puede producir su contaminación, y por tanto, errores en los resultados. Por ello, durante todo el proceso se utilizó doble guante de polietileno exento de partículas para manipular el material (matraces, pipetas, botes de teflón, micropipetas, probetas, etc.), y siempre que fue posible se utilizó material de plástico.

El material se acondicionó llevándose a cabo los siguientes pasos de limpieza: Lavar el material con agua y jabón, enjuagar con agua y con  $\text{HNO}_3$  3 mol·L<sup>-1</sup> ( $\text{HNO}_3$ , 65 %, Panreac. Barcelona, España), para finalmente enjuagar con agua Milli-Q repitiéndolo cinco veces. Almacenar en bolsas de plástico transparente hasta su utilización.

#### 3.2. Síntesis de SAPH

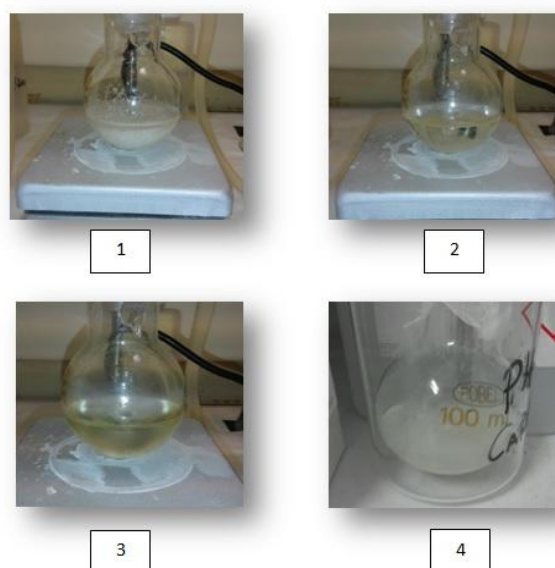
El reactivo empleado para la optimización de nuestro método espectrofluorimétrico, ha sido la picolinoilhidrazona del salicilaldehído (SAPH), reactivo complejante que no se comercializa y que forma con el aluminio un complejo fluorescente de color azul-verdoso.

El SAPH está compuesto por la picolinoilhidracida (PH), y el salicilaldehído (SA), este último sí se comercializa, pero en el caso de la PH también es necesario sintetizarla.

##### 3.2.1. Síntesis de la Picolinoilhidracida (PH)

La obtención de la hidracina del ácido picolínico se ha llevado a cabo según lo descrito por Panos Grammaticakis (1955) [58]. Dicho compuesto se obtiene por calentamiento del éster etílico del ácido picolínico (PAEE) e hidracina en relación molar 1:1, según el siguiente proceso:

Se mezclan 10 mL de PAEE con 5,2 mL de hidrato de hidracina y se adicionan 5 mL de etanol. Se mantiene la mezcla a reflujo durante media hora, enfriando y dejando el producto sólido en el matraz doce horas a 5 °C. El precipitado obtenido se filtra, se recrystaliza con benceno y se lleva de nuevo al frigorífico (Figura 7).



**Figura 7. Recristalización de la PH con benceno: 1) Benceno y PH; 2) y 3) Calentamiento y disolución; 4) Precipitación a 5 °C.**

El punto de fusión de este sólido cristalino en forma de agujas blancas es de 101 °C, siendo necesario conservarlo en condiciones de sequedad a una temperatura de 5 °C.

A continuación se muestran los reactivos empleados para la síntesis de la PH (Tabla 1).

**Tabla 1. Reactivos empleados en la síntesis de la PH.**

Nombre	Fórmula	Peso Fórmula (g·mol <sup>-1</sup> )	Pureza	d (g·mL <sup>-1</sup> )	Proveedor
PAEE	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	151	----	----	Sigma
Hidrato de hidracina	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	50	> 99,9 %	1,032	Sigma
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	99 %	0,79	Panreac
Benceno	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	78	> 99,9 %	876	MERCK

### 3.2.2. Síntesis de la SAPH

Este reactivo se ha preparado a partir del compuesto sintetizado anteriormente, la PH, haciéndolo reaccionar con el salicilaldehído, como se detalla a continuación [42]. Para llevar a cabo esta síntesis es conveniente no utilizar material de vidrio y evitar de esta manera la formación de cualquier quelato aluminico.



En primer lugar, se mezclan en relaciones equimolares, en un matraz de fondo redondo, 0,28 gramos de picolinoilhidracida previamente disuelta en 10 mL de etanol con 0,26 mL de salicilaldehído. A continuación, la mezcla se calienta suavemente durante unos 15 minutos. Una vez realizado esto, se deja reposar durante 12 horas a 5 °C y se filtra, recristalizándose finalmente en etanol.

Este reactivo presenta un aspecto de cristales de color amarillo anaranjado (Figura 8).



**Figura 8. Pesada de la PH y síntesis de SAPH.**

A continuación se muestran los reactivos empleados para la síntesis de la SAPH (Tabla 2).

**Tabla 2. Reactivos empleados en la síntesis de la SAPH.**

Nombre	Fórmula	Peso Fórmula (g·mol <sup>-1</sup> )	Pureza	d (g·mL <sup>-1</sup> )	Proveedor
Picolinoilhidracida	----	----	----	Sólido	----
Salicilaldehído	2-(OH)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CHO	112,12	99 %	1,032	MERCK
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	Para análisis	0,79	Panreac

### 3.3. Procedimiento de preparación de muestras

Para la preparación de las muestras se siguió siempre el mismo procedimiento. En un volumen de 5 mL se adicionó en el siguiente orden: la disolución reguladora, disolución de SAPH, volumen de etanol correspondiente, 0,5 mL de muestra (dilución 1:10) y se completó con agua Milli-Q. Para que el sistema Al(III)-SAPH en medio acetato y en solución etanólica-acuosa fuese estable, era necesario un tiempo de reacción de 20-30 minutos antes de proceder a medir la señal de fluorescencia obtenida.

### 3.4. Equipos

- **Espectrofluorímetro**

Las medidas realizadas por fluorescencia se llevaron a cabo mediante un espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (Figura 9), donde se introduce una cubeta de cuarzo con el contenido de la muestra que se desea analizar. Una vez la muestra es introducida en el equipo, se ajustan los parámetros necesarios ( $\lambda_{ex}$ ,  $\lambda_{em}$ , ancho de rendija) para que la señal de fluorescencia sea lo más intensa y limpia posible y de esta manera determinar la concentración de aluminio en la muestra a analizar.



**Figura 9. Espectrofluorímetro JASCO FP-6500.**

- **Espectrómetro de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)**

La espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (espectrómetro de masas serie X7 (II) (Thermo Elemental, Reino Unido)) (Figura 10) se usó como técnica de referencia para validar los resultados obtenidos por fluorescencia. Como patrón interno se utilizó una disolución de rodio ( $^{103}\text{Rh}$ ). Este análisis fue realizado en la División de Espectroscopía de los Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Cádiz.



**Figura 10. Equipo ICP-MS localizado en los Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Cádiz.**

### 3.5. Material biológico

El material biológico a utilizar en la optimización de nuestro método fueron muestras de moluscos bivalvos, *Callista chione*, las cuáles fueron recogidas en dos campañas de muestreos en la costa litoral marroquí, en Octubre de 2007 y Octubre de 2008 como parte de un proyecto anterior. A los moluscos bivalvos, tras la toma de muestra, se le extrajo la carne y se liofilizó. Una vez liofilizada, las muestras fueron digeridas mediante digestión asistida por microondas, siguiendo el siguiente método de digestión previamente optimizado en el grupo de investigación, que consta de tres etapas:

- Se toman 0,25 g de muestra a las que se le añade 4,5 mL de  $\text{HNO}_3$  y 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Se calienta durante 15 minutos en microondas a 180 °C.
- Se filtra y se enrasa a 50 mL.

Se digirieron los organismos completos porque el objetivo es evaluar la cantidad de aluminio que podría incorporarse al ser ingeridos por el ser humano, ya que se trata de una especie con valor comercial.

*Callista chione* es un bivalvo comestible, fácil de distinguir por su gran tamaño, que presenta una concha sólida, ovalada y con las valvas de superficie lisa, brillante, de color marrón, mientras que su interior es blanco. Pueden alcanzar hasta los 10 cm de tamaño (Figura 11) [59].



**Figura 11. Callista Chione**

### 3.6. Zona de estudio

La zona de estudio se localiza en el norte de Marruecos, concretamente en una zona del litoral mediterráneo que corresponde a las provincias de Tetuán y Chaouen, las cuales poseen un gran potencial socio-económico en diferentes sectores como el turismo, la pesca y el tráfico marítimo, lo que conlleva la existencia de numerosas fuentes de contaminación de sustancias peligrosas tanto a nivel industrial como a nivel urbano, ya que en la mayoría de los casos, estas sustancias peligrosas se vierten directa o indirectamente al mar, sin ningún tipo de tratamiento previo o con un tratamiento muy pobre [60–63].

La provincia de Tetuán incluye tres centros urbanos de importancia que son Martil, Fnidek y M'diq, algunos centros rurales como Oued Laou y Azla, y varios complejos turísticos como Cabo Negro localizados cerca de la costa del Mediterráneo. De las cuatro zonas de muestreo (Figura 12), se ha seleccionado únicamente el punto 1 de cada una de ellas (Figura 13). En la tabla 3, se puede observar la localización geográfica exacta del punto 1 de cada una de las distintas zonas de muestreo [36].

**Tabla 3. Localización y características de las muestras tomadas en cada zona.**

		Latitud	Longitud	Profundidad (m)	Distancia a costa (m)
<b>Cabo Negro</b>	<b>P1</b>	N35°39,551	W005°16,695	4	368
<b>Martil</b>	<b>P1</b>	N35°36,540	W05°15,686	5	490
<b>Oued Laou</b>	<b>P1</b>	N35°26,147	W05°04,628	5	280
<b>Djaouen</b>	<b>P1</b>	N35°21,807	W004°57,879	7	425

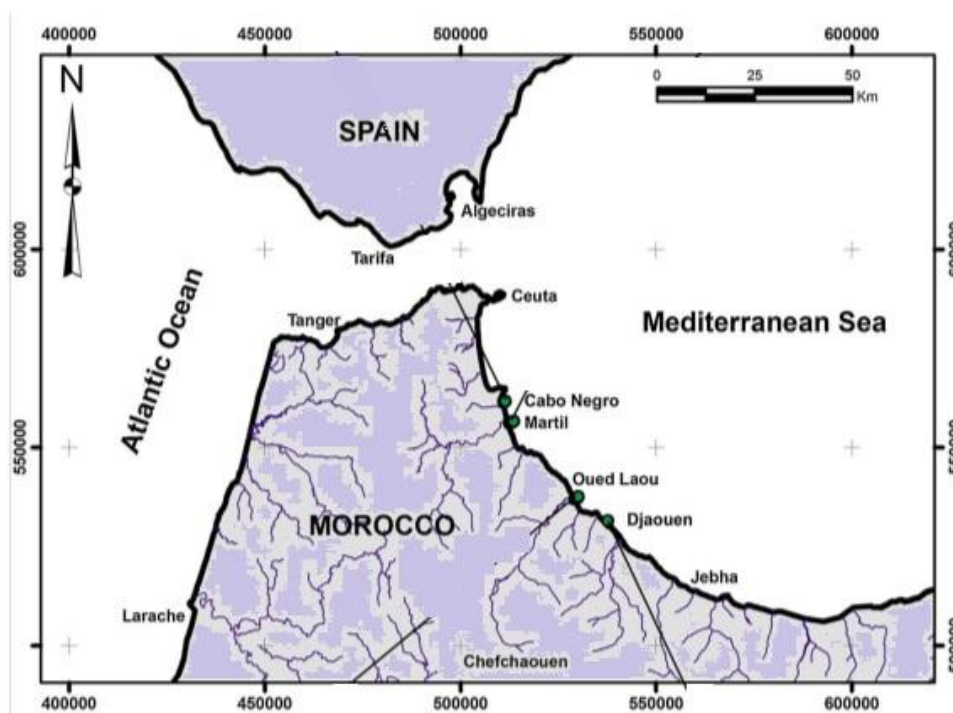


Figura 12. Zonas de muestreo.

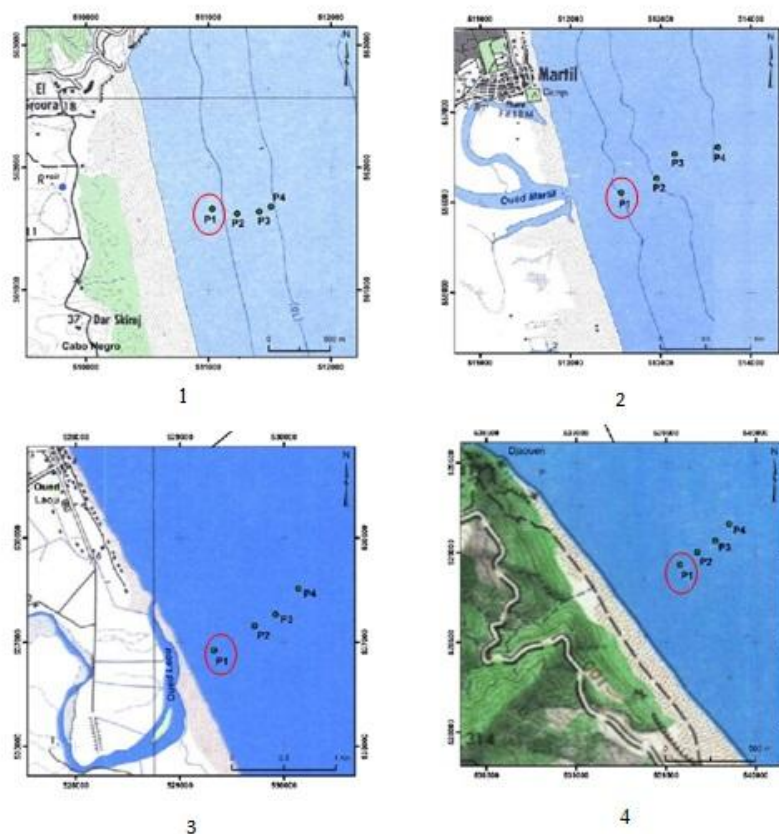


Figura 13. Mapa de la zona de estudio, 1) Cabo Negro; 2) Martil; 3) Oued Laou; 4) Djaouen.

A continuación, se van a detallar las características particulares de cada una de las cuatro zonas de muestreo:

**Zona de Cabo Negro:** Cabo Negro está situada entre dos núcleos urbanos de población, como son Martil al sur y M'diq al norte, con una importante actividad portuaria, viéndose afectada por ambos núcleos urbanos.

**Zona de Martil:** Esta zona se caracteriza por una importante actividad industrial y turística, esta última principalmente en los meses de verano. Es la zona más cercana a un centro urbano, Tetuán y Martil, y, por tanto, se vierten las aguas residuales de ambos núcleos de población directamente o indirectamente a través del río que baña la zona.

**Zona de Oued Laou:** Es una zona que se encuentra relativamente alejada de cualquier núcleo de población, aunque se encuentra justo en la desembocadura del río Oued Laou, donde las actividades más habituales son la agricultura y la pesca artesanal.

**Zona de Djaouen:** Es la zona que se encuentra más al sur y es la más alejada de los centros urbanos. No se identifican actividades agrícolas o industriales en las proximidades de este punto.

### 3.7. Diseño de experimentos-Box-Behnken (DBB)

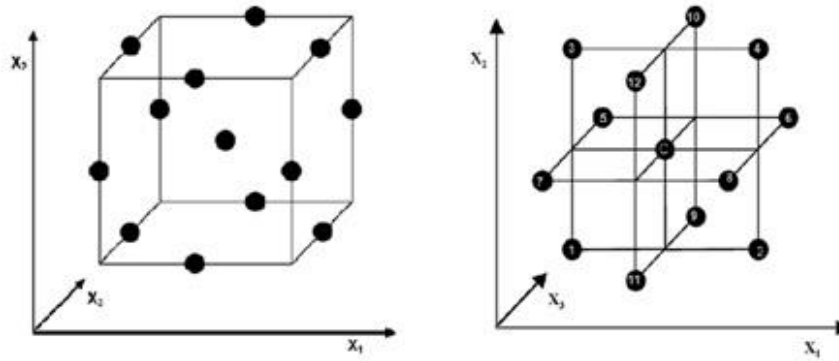
Para la optimización del método espectrofluorimétrico se realizó un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken, usando para ello, el programa informático STATGRAPHICS Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc. USA). Este diseño tiene dos tipos de variables: factores, que serán las variables independientes (pH, reguladora, SAPH y % etanol) y respuestas, que serán las variables dependientes (la señal de fluorescencia). Cada uno de los factores seleccionados tiene un máximo de tres valores posibles (-1,0,1), que dependerán de los resultados previos obtenidos mediante la realización de análisis univariantes.

El número de experimentos requeridos para el desarrollo del DBB queda definido como (Ecuación 3):

$$N = 2 \cdot k \cdot (k - 1) + C_0$$

#### **Ecuación 3. Expresión para el cálculo del número de experimentos.**

Donde k es el número de factores y  $C_0$  es el número de puntos centrales, en nuestro caso 4 y 3, respectivamente, resultando un número total de 27 experimentos. Básicamente, el DBB consiste en un cubo con un punto central y puntos en el centro de las aristas que lo forman, donde los ejes representan cada factor y sus vértices el valor máximo y mínimo de los mismos (Figura 14).



**Figura 14. Representación gráfica del modelo Box-Behnken de 3 factores.**

Los resultados obtenidos se tratan mediante la metodología de superficies de respuesta, la cual genera un modelo matemático que se ajusta a las respuestas experimentales obtenidas en cada una de las condiciones (Ecuación 4), donde se puede observar la respuesta de nuestro sistema en función de los factores implicados y las interacciones que existen sobre los mismos. Además, los diseños obtenidos resultan ser más eficientes en términos del número de experimentos requeridos.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} \cdot x_i x_j + r$$

**Ecuación 4. Polinomio de segundo orden cuando existe curvatura en el sistema.**

En la ecuación de ajuste,  $y$  es la respuesta,  $\beta_i$  es el coeficiente para cada efecto principal,  $\beta_{ij}$  el coeficiente correspondiente a las interacciones  $i, j$ ,  $\beta_{ii}$  el coeficiente de los factores cuadráticos que representan la curvatura de la superficie,  $x$  representa cada factor y  $r$  es el valor residual.

A partir de esta ecuación, se puede determinar las condiciones óptimas para cada uno de los 4 factores estudiados.

Además mediante el estudio del análisis de la varianza (ANOVA), se puede estimar la influencia de cada variable y/o interacción sobre la respuesta. Esto se realiza comparando la varianza debida a modificaciones en los niveles de los factores con la debida a los residuos.

### 3.8. Validación del método y cálculo de la incertidumbre combinada

Para la validación del método se han tenido en cuenta una serie de parámetros que permiten evaluar el grado de adecuación al problema del mismo. Para ello, se ha seguido el orden establecido por Eurachem, red de organizaciones en Europa que tienen el objetivo de establecer



un sistema de trazabilidad internacional de las mediciones químicas y la promoción de buenas prácticas de calidad [53]. Los parámetros analizados se muestran a continuación:

- Confirmación de la identidad

En este caso en concreto, para el Al, se ha realizado el análisis de muestras digeridas de moluscos tanto por el método propuesto como por determinación directa por ICP-MS para establecer si existen o no diferencias significativas entre ambos métodos.

- Selectividad y especificidad

El estudio de interferencias fue llevado a cabo mediante la comparación de los resultados de la calibración externa con patrones acuosos y el método de las adiciones estándar.

- Intervalos lineal y de trabajo

Es conveniente que el intervalo de trabajo sea lineal, para ello es necesario emplear los coeficientes de calidad de la recta (QC %) [64], que establecen el sesgo de la medida de cada patrón, para estimar la bondad de la linealidad del intervalo de trabajo (Ecuación 5).

$$QC (\%) = 100 \cdot \sqrt{\frac{\left(\frac{Y_i - \hat{Y}}{\bar{Y}}\right)^2}{N - 1}}$$

**Ecuación 5. Coeficiente de calidad de la recta.**

Donde  $Y_i$  es la señal de la medida para un patrón determinado,  $\hat{Y}$  es la señal calculada utilizando una curva de calibración con N patrones e  $\bar{Y}$  es la señal media de todos los patrones.

- Exactitud (Sesgo y Precisión)

El sesgo se expresa normalmente en forma de porcentaje de recuperación del analito en la muestra (Ecuación 6) y existen dos técnicas que permiten estudiarlo: la comparación del valor analizado con el de referencia para un material determinado o en caso de no existir éste, la comparación con el valor obtenido por otro método considerado de referencia [65].

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{C_{\text{Metal analizada}}}{C_{\text{Metal referencia}}} \cdot 100$$

**Ecuación 6. Porcentaje de recuperación.**



La precisión es una medida del error aleatorio asociado al método analítico. Expresa la proximidad de una serie de resultados obtenidos a partir de distintas tomas de muestra de un producto perfectamente homogéneo. Se habla por lo general de repetibilidad y reproducibilidad, siendo la primera una medida de la precisión de un método bajo las mismas condiciones de operación y en un intervalo de tiempo corto [51], mientras que la reproducibilidad se refiere a análisis realizados por diferentes laboratorios durante una escala de tiempo más amplia, como pueden ser los ejercicios de intercomparación [66].

- Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD), se expresa como tres veces la desviación estándar del blanco dividido por la pendiente de la recta de calibrado (Ecuación 7).

$$\text{LOD} = \frac{3S_b}{m}$$

#### **Ecuación 7. Fórmula para calcular límite de detección.**

Donde  $S_b$  es la desviación estándar del blanco y  $m$  es la pendiente de la recta de calibrado.

El límite de cuantificación es superior al del límite de detección y queda definido de la siguiente forma, diez veces la desviación estándar del blanco dividido por la pendiente de la recta de calibrado.

$$\text{LOQ} = \frac{10S_b}{m}$$

#### **Ecuación 8. Fórmula para calcular límite de cuantificación.**

Donde  $S_b$  es la desviación estándar del blanco y  $m$  es la pendiente de la recta de calibrado.

- Robustez

El estudio se realizó teniendo en cuenta el efecto de llevar a cabo nuevas síntesis de SAPH por un lado, y el tiempo que transcurre entre la preparación de las muestras y el momento que se realiza el análisis mediante el espectrofluorímetro.

#### **3.8.1. Cálculo de la incertidumbre combinada**

Para el cálculo de la incertidumbre se ha utilizado el método de Kragten que es un método numérico rápido y universal aplicable para la estimación de la incertidumbre empleando hojas de cálculo en MS Excel. Este método se fundamenta en las fórmulas generales de la ley de propagación de la incertidumbre, calculando las desviaciones típicas sin violar la condición de independencia mutua [67].

Este método únicamente necesita los valores de las magnitudes de entrada y sus incertidumbres típicas. Partiendo de la ley de propagación de la incertidumbre en su forma más genérica y llevando a cabo una serie de simplificaciones, se llega a la ecuación 9, que se empleó para el cálculo de la incertidumbre combinada [67].

$$\left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot u_p \approx \frac{\Delta y}{\Delta p} \cdot u_p$$

**Ecuación 9. Método de Kragten.**

En el Anexo 2 se detallan los cálculos realizados para un caso particular.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se exponen los resultados de la optimización y validación del método propuesto, que posteriormente se ha aplicado a muestras digeridas de moluscos del litoral marroquí. El esquema llevado a cabo para este apartado ha sido el siguiente:

- Estudios preliminares de fluorescencia del complejo Al(III)-SAPH.
- Estudios univariantes de las variables más significativas del sistema para establecer el intervalo de trabajo más adecuado de cada una de ellas.
- Aplicación de un diseño de experimentos Box-Behnken con 4 factores y 3 puntos centrales.
- Validación del método propuesto siguiendo las especificaciones de la ISO 17025.
- Aplicación a diferentes muestras de *Callista chione*.
- Comparativa con otros métodos encontrados en la bibliografía.

### 4.1. Estudios preliminares

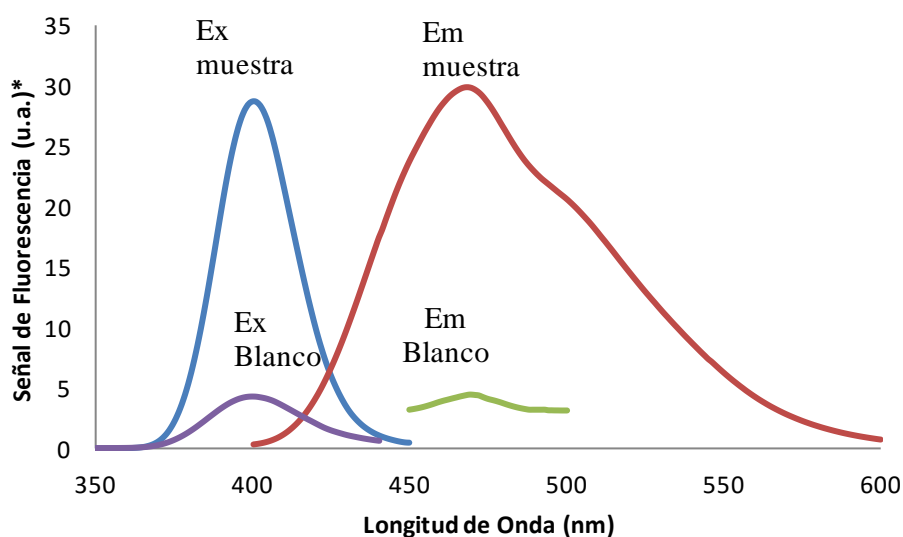
#### 4.1.1. Determinación de los espectros de excitación y emisión y de la estequiometría del complejo Al(III)-SAPH

El sistema Al(III)-SAPH produce una señal de fluorescencia verde-azulada a valores de pH entre 5 y 7, para lo que se reguló el pH del medio con AcH/Acetato, presentado la disolución de Al-SAPH un color débilmente amarillento.

Para el registro de los espectros de excitación y de emisión de la especie fluorescente se realizaron barridos automáticos, que permiten seleccionar los intervalos de longitudes de onda más adecuados en cada caso. Para la realización de los barridos, se empleó un blanco que contenía, disolución reguladora AcH/Acetato 0,5 M a pH 5,4 [43], disolución de SAPH 0,189 mM, 24 % de etanol, completando con agua Milli-Q hasta 15 mL y una muestra que contenía, disolución reguladora AcH/Acetato 0,5 M a pH 5,4 [43], disolución de SAPH 0,189 mM, 24 % de etanol, volumen de muestra de digerido de molusco en dilución 1:10 y completando con agua Milli-Q hasta 15 mL.

En la figura 15 se presentan los espectros de excitación y emisión del quelato de Al, donde se observó que los máximos de excitación y emisión fueron,  $\lambda_{ex} = 398$  nm y  $\lambda_{em} = 469$  nm, respectivamente.

Se ha estudiado además, la influencia de los parámetros instrumentales que afectan a la radiación emitida por el complejo. Así, del estudio de la señal fluorescente relativa a distintos anchos de rendijas, tanto para la excitación como para la emisión, se ha observado que conforme aumentan éstos, lo hace también la señal de fluorescencia. No obstante, como también aumenta el ruido de fondo se ha seleccionado como valor medio óptimo para el ancho de bandas de rendijas un valor de 3 nm.



**Figura 15. Espectros de excitación y emisión de una muestra y su respectivo blanco.**

\*Señal de fluorescencia (u.a.), unidades arbitrarias.

## 4.2. Estudios Univariantes

En este trabajo, se realizaron 4 estudios univariantes, uno por cada factor a estudiar. Al realizar estos estudios, se puede determinar de una manera aproximada en que rango de valores de cada factor, se encontrará el valor óptimo que finalmente se estudiará mediante el diseño de experimentos. Para evitar una nueva síntesis de SAPH y debido a que se realiza este estudio para tener una idea preliminar, sólo se ha realizado una réplica.

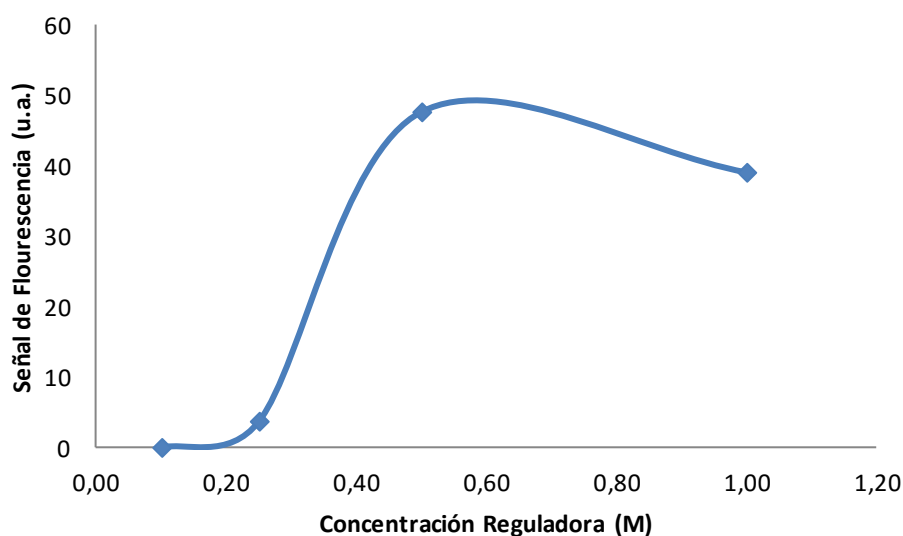
### 4.2.1. Influencia de la disolución reguladora

Este estudio consistió en evaluar como variaba la señal de fluorescencia en función de la concentración de la disolución reguladora, manteniendo fijas el resto de variables, es decir, la concentración de reactivo, el pH y el porcentaje de etanol.

Para ello, en un volumen de 5 mL se adicionaron 0,75 mL de una disolución de SAPH  $2 \cdot 10^{-2}$  M y 0,75 mL de etanol, de manera que en el recipiente la concentración de SAPH fue de 3 mM, el porcentaje de etanol fue del 30 % y el pH se mantuvo constante a 5,4; añadiendo el volumen de disolución reguladora correspondiente a cada experimento. Finalmente se adicionaron 0,5 mL

de muestra de digerido de molusco y se completó hasta 5 mL con agua Milli-Q. Las medidas se realizaron al cabo de 20-30 minutos frente a blancos preparados de igual forma pero sin adición de muestra digerida.

Como se puede observar en la figura 16, la concentración de disolución reguladora a la que se obtuvo una mayor señal de fluorescencia fue 0,5 M. Por lo que para el resto de estudios univariantes, se empleó dicha concentración de reguladora, añadiendo un volumen de 1,25 mL de disolución reguladora procedente de la disolución 2 M.



**Figura 16. Variación de la señal de fluorescencia con la concentración de reguladora.**

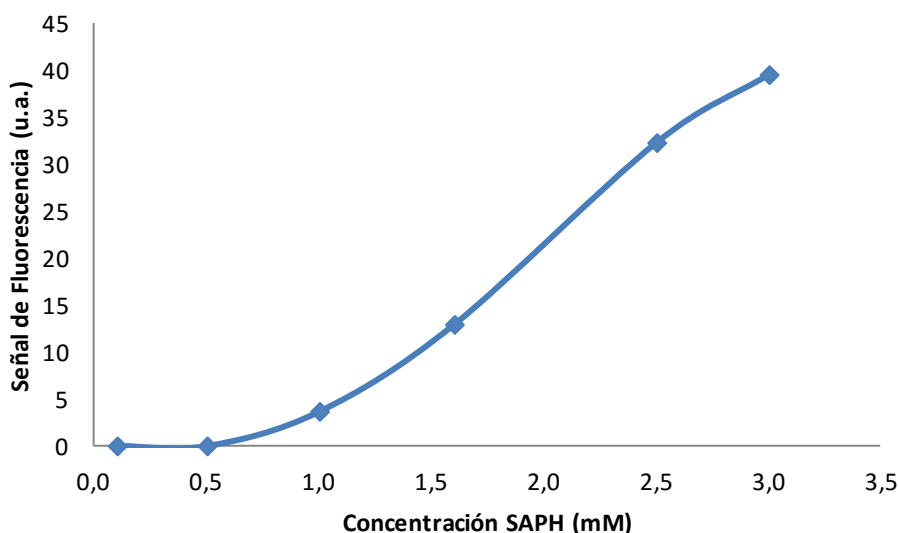
#### 4.2.2. Influencia del reactivo SAPH

Con este estudio, se evaluó la variación de la señal de fluorescencia en función de la concentración de SAPH, es decir, se mantuvieron fijas, la concentración de reguladora, el pH y el porcentaje de etanol.

Para ello, en un volumen de 5 mL se adicionaron 1,25 mL de una disolución reguladora 2 M y un volumen de etanol que varió en función de la concentración de SAPH, debido a que éste está preparado en etanol.

De este modo la concentración de reguladora fue de 0,5 M, el porcentaje de etanol fue del 30 % y el pH se mantuvo constante a 5,4; añadiendo el volumen de disolución de SAPH correspondiente a cada experimento. Finalmente se adicionaron 0,5 mL de muestra de digerido de molusco y se completaron los 5 mL con agua Milli-Q. Las medidas se realizaron al cabo de 20-30 minutos frente a blancos preparados de igual forma pero sin muestra de digerido de molusco.

Se puede observar en la figura 17 que la señal de fluorescencia continúa creciendo a medida que la concentración de SAPH es mayor, pero cabe destacar que a partir de 20 mM el reactivo da lugar a un precipitado. Por tanto, la concentración de SAPH a la que la señal de fluorescencia es mayor es 3 mM, fijándose esta concentración para los siguientes experimentos.



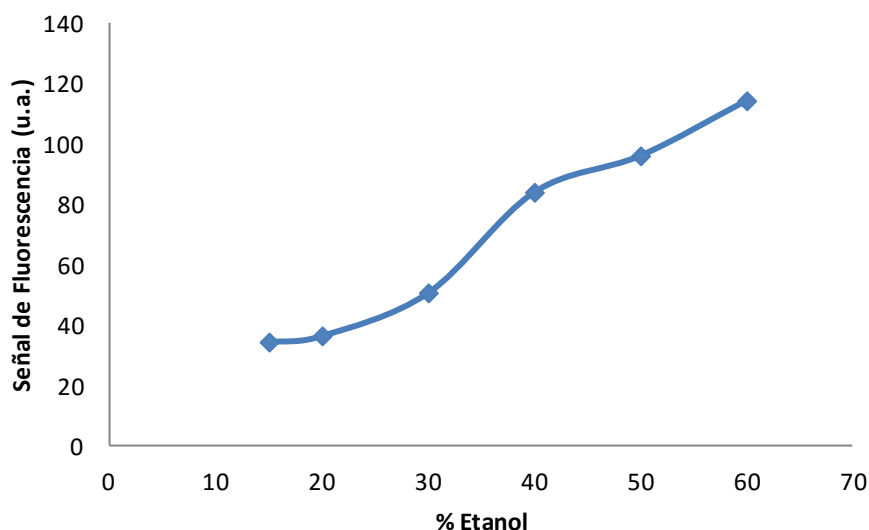
**Figura 17. Variación de la señal de fluorescencia con la concentración de SAPH.**

#### 4.2.3. Influencia del porcentaje de etanol

A continuación se estudió la evolución de la señal de fluorescencia en función del porcentaje de etanol, es decir, se mantuvieron fijas, la concentración de reguladora, el pH y la concentración de SAPH.

Para ello, en un volumen de 5 mL se adicionaron 1,25 mL de una disolución de reguladora 2 M y 0,75 mL de la disolución 20 mM de SAPH preparada en etanol. En el bote la concentración de reguladora fue de 0,5 M, la concentración de SAPH fue de 3 mM y el pH se mantuvo constante a 5,4; añadiendo el porcentaje de etanol correspondiente a cada experimento. Finalmente se adicionaron 0,5 mL de muestra de digerido de molusco y se completaron los 5 mL con agua Milli-Q. Las medidas se realizaron al cabo de 20-30 minutos frente a blancos preparados de igual forma pero sin muestra de digerido de molusco.

El porcentaje de etanol al que se obtuvo la mayor señal de fluorescencia fue al 60 %. Se puede observar en la figura 18 como la señal presenta una tendencia claramente ascendente, sin embargo, puede observarse una pequeña estabilización en el intervalo de 40-50 %, razón por la cual para la optimización multivariante posterior se seleccionó el 50 %. Por otra parte, al obtener resultados satisfactorios empleando el 50 % de etanol, se consideró como valor adecuado dicho porcentaje.



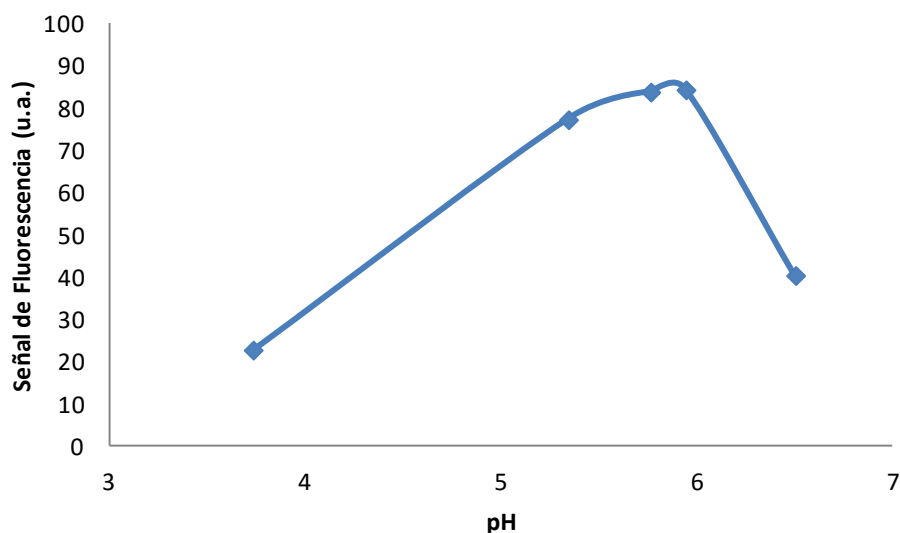
**Figura 18. Variación de la señal de fluorescencia con el porcentaje de etanol.**

#### 4.2.4. Influencia del pH

En este apartado, se ha comprobado el efecto que tiene el pH del medio sobre la emisión radiante del sistema Al(III)-SAPH. Para ello se fue modificando el pH final del sistema mientras se mantuvieron fijas las tres variables restantes.

Al igual que en los casos anteriores para un volumen de 5 mL se adicionaron 1,25 mL de la disolución reguladora 2 M, 0,75 mL de la disolución 20 mM de SAPH preparada en etanol y 50 % de etanol. En el bote la concentración de reguladora fue de 0,5 M, la concentración de SAPH fue de 3 mM y el porcentaje de etanol se mantuvo constante a 50 %, utilizando en cada caso el pH correspondiente a cada experimento. Finalmente se adicionaron 0,5 mL de muestra digerida de molusco y se completaron los 5 mL con agua Milli-Q. Las medidas se realizaron al cabo de 20-30 minutos frente a blancos preparados de igual forma pero sin muestra de digerido de molusco.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 19, siendo el valor de pH del medio donde la señal de fluorescencia dio unos mejores resultados, aproximadamente 6, pH ligeramente ácido donde se favorece la formación del complejo fluorescente del reactivo SAPH con el aluminio.



**Figura 19. Variación de la señal de fluorescencia con el pH del medio.**

#### 4.3. Optimización del método espectrofluorimétrico mediante el diseño de experimentos Box-Behnken

Una vez se realizaron los estudios univariantes para cada uno de los cuatro factores objeto de estudio, se procedió a realizar un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken con el fin de encontrar las mejores condiciones experimentales.

A cada factor se le asignaron los tres niveles posibles (-1, 0, +1) correspondientes a los dos niveles extremos, inferior y superior y al punto central, quedando finalmente cada factor definido por los niveles que se muestran a continuación en la tabla 4. Estos niveles se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios univariantes.

**Tabla 4. Niveles definidos para cada factor.**

Variables independientes (Unidades)	Niveles		
	Nivel inferior (-1)	Punto Central (0)	Nivel superior (+1)
<b>pH</b>	4,7	5,7	6,7
<b>Reguladora (M)</b>	0,3	0,6	0,9
<b>SAPH (mM)</b>	2	2,5	3
<b>Etanol (%)</b>	20	35	50



Una vez asignados los tres niveles posibles para cada factor y seleccionada la señal de fluorescencia como la variable respuesta, se organizaron los experimentos de forma aleatoria para evitar errores sistemáticos.

Para el tratamiento de datos, se empleó el programa Statgraphics Centurion XVI, devolviéndonos a partir de la ecuación 1, detallada anteriormente, el número de experimentos totales a realizar, siendo en nuestro caso 27 experimentos.

Conocidos los volúmenes a adicionar en cada experimento y a su respectivo blanco se prepararon las diferentes disoluciones, completando hasta un volumen final de 5 mL, quedando todo recogido en la tabla (Anexo 3).

Los resultados de la variable respuesta obtenidos del diseño de experimentos para cada una de las condiciones experimentales se muestran a continuación en la tabla 5. Ésta se midió como la señal de fluorescencia de la muestra menos la señal del blanco. En los casos en los que la señal obtenida para la muestra fue igual o inferior a la del blanco, fue utilizado el valor de respuesta 0 para ajustar las respuestas experimentales al modelo matemático generado por el diseño.

**Tabla 5. Resultados obtenidos del diseño de experimentos.**

Experimento	pH	Reguladora (M)	SAPH (mM)	Etanol (%)	Señal de Fluorescencia (u.a.)*
1	5,7	0,6	2,5	35	7,84
2	5,7	0,9	3	35	8,71
3	5,7	0,6	3	20	0
4	6,7	0,3	2,5	35	11,68
5	4,7	0,6	3	35	0
6	5,7	0,6	2	20	0
7	5,7	0,6	2,5	35	5,15
8	5,7	0,9	2,5	50	16,38
9	4,7	0,9	2,5	35	0
10	4,7	0,3	2,5	35	0
11	6,7	0,6	2	35	38,67
12	4,7	0,6	2,5	50	0
13	5,7	0,6	2	50	0
14	5,7	0,3	2	35	0
15	6,7	0,6	3	35	47,69

**Cont. Tabla 5. Resultados obtenidos del diseño de experimentos.**

Experimento	pH	Reguladora (M)	SAPH (mM)	Etanol (%)	Señal de Fluorescencia (u.a.)*
16	4,7	0,6	2	35	0
17	5,7	0,3	3	35	0
18	6,7	0,6	2,5	50	53,19
19	4,7	0,6	2,5	20	0
20	5,7	0,6	2,5	35	14,47
21	5,7	0,3	2,5	20	0
22	5,7	0,6	3	50	24,68
23	5,7	0,9	2	35	8,39
24	6,7	0,9	2,5	35	61,10
25	5,7	0,3	2,5	50	15,83
26	6,7	0,6	2,5	20	24,68
27	5,7	0,9	2,5	20	0

\* Señal de fluorescencia (u.a.), unidades arbitrarias.

- **Estudio de la varianza del sistema**

Una vez obtenidos los resultados experimentales, se realizó un análisis de la varianza para evaluar el efecto de las variables y las posibles interacciones entre ellas, recogidos en la tabla 6. Sólo aquellas variables que presentan un P-valor inferior a 0,05 se consideran que influyen de manera estadísticamente significativa sobre la respuesta para un nivel de confianza del 95 %. El efecto significativo se calculó utilizando el estadístico F, cociente entre la suma de cuadrados debida a cada factor y la suma de cuadrados de los residuos. Cuando el valor de  $F_{\text{calculado}}$  fue mayor al valor  $F_{\text{tabulado}}$  (4,489) se consideró el efecto como significativo en la respuesta. Como se puede observar en la tabla 6, cumplen esta condición el pH, la disolución reguladora, el % de etanol y las interacciones pH-pH, pH-reguladora y pH-etanol.

Por otra parte, el análisis de la varianza proporciona información sobre el modelo matemático que se genera a partir de los datos experimentales. El porcentaje de ajuste obtenido fue del 94,01 %, lo que indica que el modelo ajustado de esta forma, explica satisfactoriamente la variabilidad de la intensidad de la señal de fluorescencia. Otra información que proporciona el modelo es el valor del error estándar del estimado, siendo de 6,479; que hace referencia a la desviación estándar de los residuos, así como el error medio absoluto que indica que el valor promedio de los residuos es de 3,584.

**Tabla 6. Tabla ANOVA.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>pH</b>	4681,15	4681,15	111,51	<b>0,000</b>
<b>Reguladora</b>	374,86	374,86	8,93	<b>0,011</b>
<b>SAPH</b>	96,44	96,44	2,30	0,155
<b>Etanol</b>	607,76	607,76	14,48	<b>0,003</b>
<b>pH-pH</b>	779,72	779,72	18,57	<b>0,001</b>
<b>pH-Reguladora</b>	610,58	610,58	14,54	<b>0,003</b>
<b>pH-SAPH</b>	20,34	20,34	0,48	0,499
<b>pH-Etanol</b>	203,20	203,20	4,84	<b>0,048</b>
<b>Reguladora-Reguladora</b>	27,57	27,57	0,66	0,433
<b>Reguladora-SAPH</b>	0,025	0,025	0,00	0,981
<b>Reguladora-Etanol</b>	0,075	0,075	0,00	0,967
<b>SAPH-SAPH</b>	12,28	12,28	0,29	0,599
<b>SAPH-Etanol</b>	152,27	152,27	3,63	0,081
<b>Etanol-Etanol</b>	2,54	2,54	0,06	0,810
<b>Error total</b>	503,76	41,98		
<b>Total (corr.)</b>	8406,45			

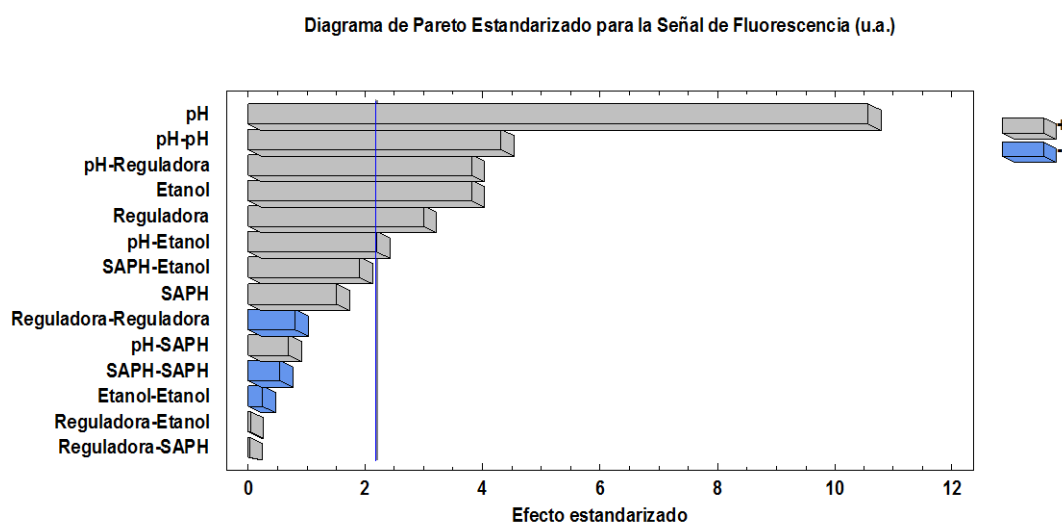
Desde un punto de vista gráfico, los resultados pueden representarse a través del diagrama de Pareto (Figura 20). Para llevar a cabo la representación del mismo es necesario estandarizar los efectos estimados de las variables del sistema. La estandarización se realiza a través del cociente entre cada efecto estimado y su error de muestreo (Tabla 7). De este modo, se obtienen unos valores numéricos sencillos que pueden ajustarse a un diagrama de barras ordenado de mayor a menor influencia. En este tipo de diagramas, la línea vertical que aparece en el gráfico muestra el valor a partir del cual (2,17), el efecto estandarizado, debe ser considerado como significativo.

Este diagrama nos permite corroborar de una manera rápida y sencilla, como se ha comentado con anterioridad a través del estudio de las distintas tablas expuestas, que las variables que afectan de forma estadísticamente significativas a la señal de fluorescencia son: el pH, la reguladora, el % de etanol y las interacciones pH-pH, pH-reguladora y pH-etanol. Además, con este diagrama se pueden estudiar en función de los signos, el efecto estimado de cada factor para la variabilidad de la respuesta. Los signos positivos indican una relación directa entre la

variable objeto de estudio y la señal de fluorescencia, mientras que los signos negativos hacen referencia a una relación inversa entre la variable objeto de estudio y la señal de fluorescencia.

**Tabla 7. Efecto estimado de cada factor.**

<b>Factor</b>	<b>Efecto Estimado</b>	<b>Error de muestreo</b>	<b>Factor</b>	<b>Efecto Estimado</b>	<b>Error de muestreo</b>
<b>pH</b>	39,50	3,74	<b>pH-Etanol</b>	14,26	6,48
<b>Reguladora</b>	11,18	3,74	<b>Reguladora-Reguladora</b>	-4,55	5,61
<b>SAPH</b>	5,67	3,74	<b>Reguladora-SAPH</b>	0,16	6,48
<b>Etanol</b>	14,23	3,74	<b>Reguladora-SAPH</b>	0,28	6,48
<b>pH-pH</b>	24,18	5,61	<b>SAPH-SAPH</b>	-3,04	5,61
<b>pH-Reguladora</b>	24,71	6,48	<b>SAPH-Etanol</b>	12,34	6,48
<b>pH-SAPH</b>	4,51	6,48	<b>Etanol-Etanol</b>	-1,38	5,61



**Figura 20. Diagrama de Pareto**

Conocida la influencia de los distintos factores, se puede decir que la señal de fluorescencia se correlaciona con las condiciones experimentales mediante la siguiente ecuación polinómica de segundo orden (Ecuación 10). En la tabla 8 aparecen recogidos cada uno de los coeficientes de la ecuación polinómica.

**Tabla 8. Coeficientes para la ecuación polinómica de segundo orden del diseño de Box-Behnken.**

Coeficiente	Estimado
Constante	570,005
pH	-170,705
Reguladora	-188,201
SAPH	-18,8003
Etanol	-4,09434
pH-pH	12,0912
pH-Reguladora	41,1833
pH-SAPH	4,51
pH-Etanol	0,475167
Reguladora-Reguladora	-25,2639
Reguladora-SAPH	0,533333
Reguladora-Etanol	0,0305556
SAPH-SAPH	-6,07
SAPH-Etanol	0,822667
Etanol-Etanol	-0,00306667

Señal de Fluorescencia (u.a.) = 570,005 - 170,705 · pH - 188,201 · Reguladora - 18,8003 · SAPH - 4,09434 · Etanol + 12,0912 · pH<sup>2</sup> + 41,1833 · pH · Reguladora + 4,51 · pH · SAPH + 0,475167 · pH · Etanol - 25,2639 · Reguladora<sup>2</sup> + 0,533333 · Reguladora · SAPH + 0,0305556 · Reguladora · Etanol - 6,07 · SAPH<sup>2</sup> + 0,822667 · SAPH · Etanol - 0,00306667 · Etanol<sup>2</sup>

**Ecuación 10. Ecuación polinómica de segundo orden del diseño de Box-Behnken.**

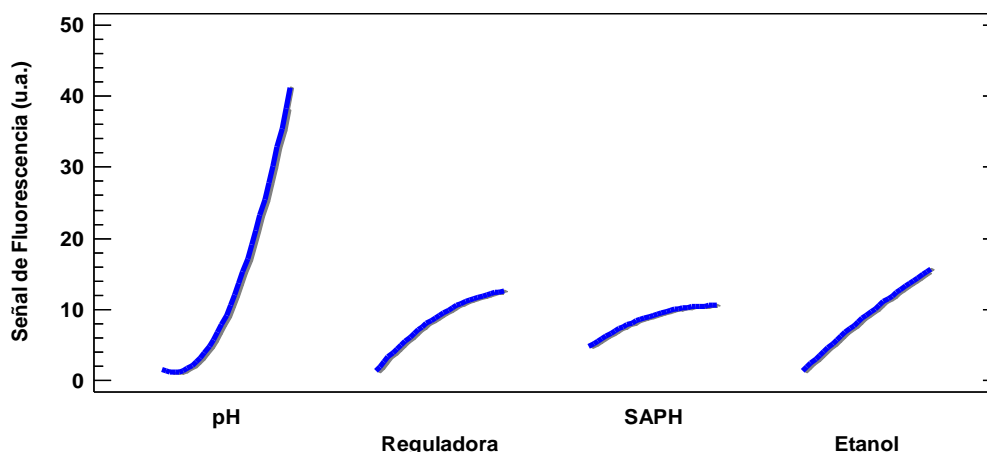
La ecuación 10 se puede simplificar teniendo en cuenta sólo aquellas variables y/o interacciones que ofrecen un efecto significativo sobre la respuesta (Ecuación 11).

Señal de Fluorescencia (u.a.) = 570,005 - 170,705 · pH - 188,201 · Reguladora - 4,09434 · Etanol + 12,0912 · pH<sup>2</sup> + 41,1833 · pH · Reguladora + 0,475167 · pH · Etanol

**Ecuación 11. Ecuación polinómica de segundo orden del diseño de Box-Behnken simplificada.**

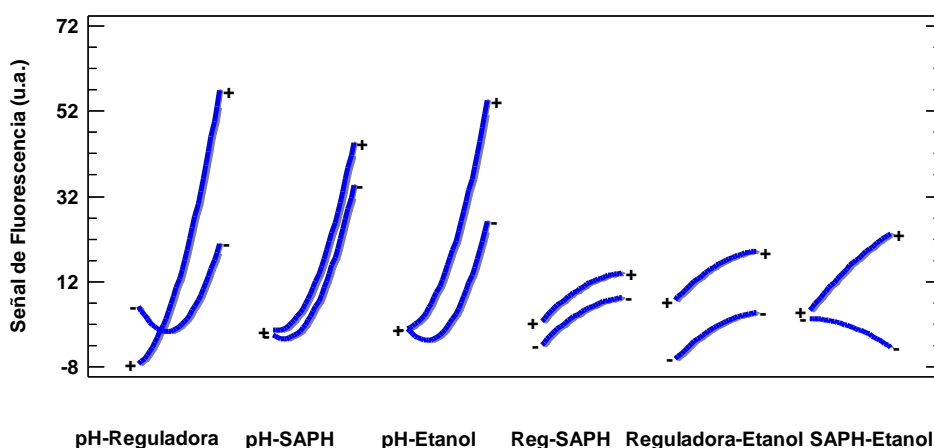
Conocidos los factores que presentan un mayor efecto sobre la señal de fluorescencia, se procede a estudiar la tendencia que sigue cada uno de los 4 factores estudiados, así como sus interacciones. En el primer caso, se puede observar a través de la figura 21, que existe una

relación directa entre la señal de fluorescencia y cada uno de los factores, alcanzando ésta su valor más alto para cada nivel superior de cada factor, con tendencia a estabilizarse para la concentración de reguladora y SAPH.



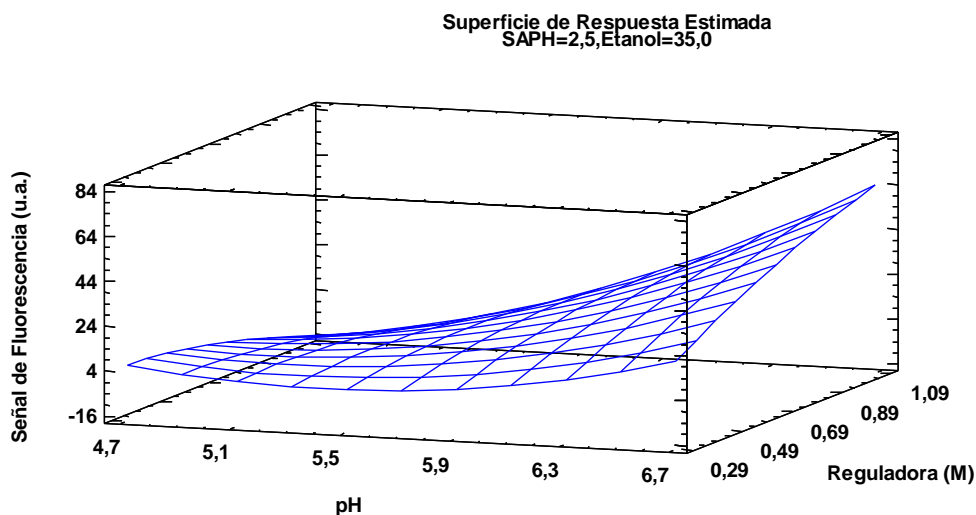
**Figura 21. Gráfico de Efectos principales para la Señal de Fluorescencia (u.a.)**

En el segundo caso, a través del gráfico de interacción entre los factores (Figura 22), se puede realizar un estudio de las interacciones de los mismos. En este caso en concreto, el pH y la reguladora se cortan, lo que evidencia la existencia de una interacción estadísticamente significativa sobre la variabilidad de la señal de fluorescencia. Además también se observa que existe una interacción significativa entre el pH-etanol, por lo que nos permite corroborar lo que anteriormente habíamos identificado a través del diagrama de Pareto (Figura 20).



**Figura 22. Gráfico de interacción entre los factores.**

A partir de la representación tridimensional se puede generar una superficie de respuesta (Figura 23). En esta figura se representa la señal de fluorescencia vs el valor de pH y la concentración de reguladora para una concentración fija de SAPH 2,5 mM y un % de etanol del 35 %.



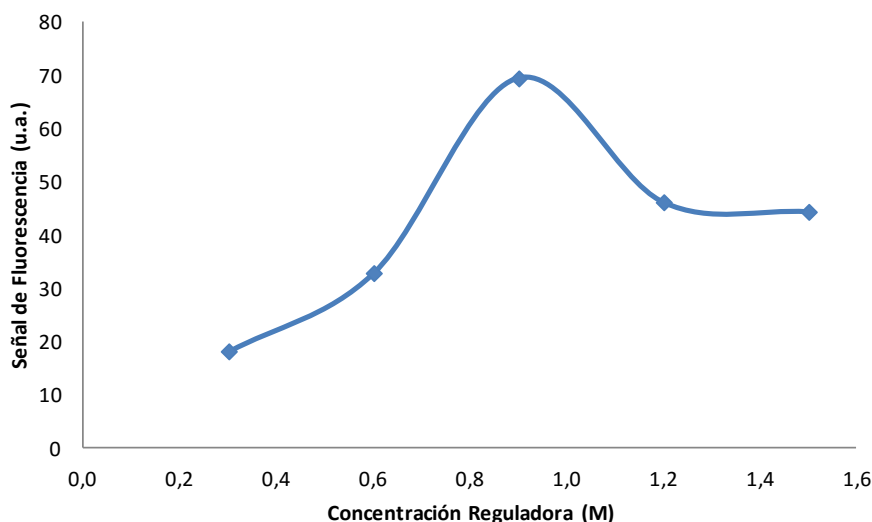
**Figura 23. Gráfico de Superficie de respuesta.**

En la figura 23 se puede observar que la mejor señal de fluorescencia para una concentración de SAPH 2,5 mM y un porcentaje de etanol del 35 %, se produce para pH cerca del extremo superior y para la máxima concentración de reguladora.

Como se ha comentado anteriormente, en la figura 21, se observa que para todos los factores, la señal de fluorescencia es mayor cuando dichos factores presentan su nivel superior. Además, en la figura 23 se evidencia que en el caso de la concentración de la reguladora existe una tendencia hacia el nivel más alto estudiado, razón por la que en el caso de la disolución reguladora se realizó un posterior estudio a concentraciones más altas, para de esta manera comprobar si se obtiene una mejor respuesta en condiciones fuera de la ventana experimental utilizada en el diseño.

Se realizó un estudio donde se fijaron las condiciones óptimas de los tres factores restantes y se fue variando la concentración de la disolución reguladora desde 0,3 M a 1,5 M.

Los resultados que se obtuvieron en este estudio se muestran en la figura 24, donde se observa que la señal de fluorescencia aumenta progresivamente hasta que la concentración de reguladora es 0,9 M, para posteriormente disminuir, confirmándose que la concentración óptima para nuestro método era de 0,9 M.



**Figura 24. Estudio Reguladora utilizando SAPH 3 Mm; Etanol 50 % y pH 6,64.**

De manera que a partir de todos los resultados estudiados se concluye que las condiciones óptimas para la determinación de aluminio en digeridos de moluscos a través de este método espectrofluorimétrico son (Tabla 9):

**Tabla 9. Condiciones óptimas del diseño de experimento.**

Condiciones óptimas			
pH	Reguladora	SAPH	Etanol
6,64	0,9 M	3 mM	50 %

#### 4.4. Validación del método propuesto siguiendo las especificaciones de la norma ISO 17025

Para poder realizar la validación de un método es necesario conocer una serie de parámetros propios del mismo que permitan evaluar su grado de adecuación al problema: confirmación de identidad, selectividad/especificidad, límites de detección y cuantificación, rangos lineal y de trabajo, exactitud, precisión, robustez, sensibilidad e incertidumbre [53], definidos previamente en el apartado de Introducción. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros durante la validación del método propuesto.

##### 4.4.1. Confirmación de identidad

En la tabla 10 se presentan los valores t-Student para la comparación de medias respecto a las concentraciones analizadas empleando ambos métodos, donde se observa como el valor del estadístico t, 4,276 ( $n=2$ ;  $\alpha=0,05$ ), es inferior al valor crítico de t dos colas. En este caso, como



no interesa si el resultado de un método respecto a otro es superior o inferior, sino si existen diferencias significativas entre ambos, nos fijamos en el valor crítico de  $t$  para dos colas, siendo este 12,706. Al ser el estadístico  $t$  inferior al valor crítico de  $t$ , se puede decir que los resultados obtenidos utilizando el método propuesto y el método de referencia no presentan diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 10. t-Student comparación de ambos métodos.**

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	Al ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Al ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Media	2959,439	2641,492
Varianza	107514,493	49612,5
Estadístico t	<b>4,27</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	<b>12,70</b>	

#### 4.4.2. Selectividad y especificidad

Para determinar la selectividad y especificidad del método se realizó una comparación entre el método de la curva de calibrado y el método de las adiciones estándar.

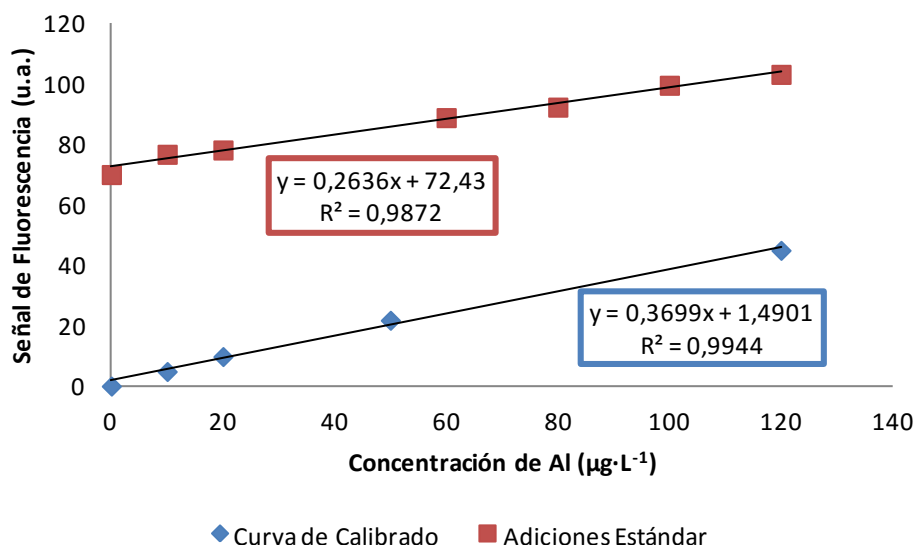
- Recta de calibrado versus método de las adiciones estándar

El método de las adiciones estándar implica preparar los patrones con la misma muestra. Para ello se toman volúmenes iguales de muestra a analizar (0,5 mL), añadiendo en orden creciente cantidades perfectamente conocidas de la especie química a determinar, en nuestro caso aluminio. Los patrones a preparar son los siguientes:  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Con ello se dispone de una serie de disoluciones que contienen además de la concentración de aluminio en moluscos, las concentraciones adicionadas, incluyendo la adición cero, en valores que se encuentran dentro del rango de linealidad. La determinación analítica sobre estas preparaciones proporciona una nueva recta de calibración. Por extrapolación de la recta sobre el eje de abscisas, para  $Y=0$ , se obtiene la concentración de aluminio correspondiente a la muestra. La ordenada en el origen corresponde a la señal de la adición cero, o sea de la muestra original, y la pendiente debería ser la misma que en el caso de la recta de calibrado preparada con patrones acuosos, en el caso de que no exista ningún tipo de interferencia debida a la matriz. Si existe alguna interferencia, las dos rectas, adiciones estándar y curva de calibrado, no serían paralelas, cruzándose o no, según el efecto de la interferencia sea depresivo o exaltador de la

señal, siendo en este caso, más fiable el resultado obtenido por extrapolación que el deducido por interpolación.

En la siguiente figura 25 se comparan los datos obtenidos por ambos métodos para el digerido de molusco en cuestión. Los resultados obtenidos muestran que las rectas no son paralelas y sus pendientes no son similares, por tanto, existen interferencias de matriz, de manera que es más fiable el uso del método de las adiciones estándar, un poco más tedioso, pero que no causa ningún gran inconveniente a la hora de realizar el análisis sobre muestras reales.



**Figura 25. Representación de la recta de calibrado y método de las adiciones estándar para determinación de aluminio en muestras digeridas de moluscos.**

#### 4.4.3. Intervalos lineal y de trabajo

El criterio seguido para estimar el intervalo lineal consiste en considerar lineal la curva de calibrado siempre que la introducción de un nuevo patrón no suponga un QC superior al 5 %. En este caso la curva de calibración para el Al es hasta los  $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 26), siendo éste el intervalo de trabajo empleado.

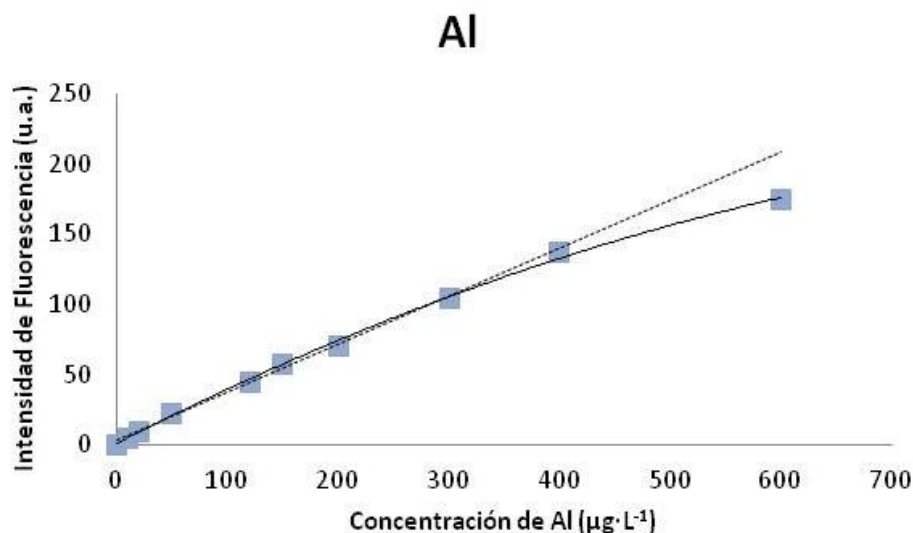


Figura 26. Intervalo lineal del método.  $\hat{Y}$ ----  $Y_i$  —

#### 4.4.4. Exactitud

- Sesgo

Para la realización de este trabajo no se disponía de material de referencia, de manera que para determinar el sesgo, es decir, el porcentaje de recuperación, se ha comparado el valor analizado con el método propuesto, con el valor obtenido por otro método ya validado como es el del ICP-MS. Obteniéndose un porcentaje de recuperación del 109,81 % que se puede considerar adecuado. Se puede observar como la concentración determinada por el método de referencia se encuentra dentro de los límites marcados por la desviación estándar de las medidas experimentales, realizadas con el método propuesto (Figura 27).

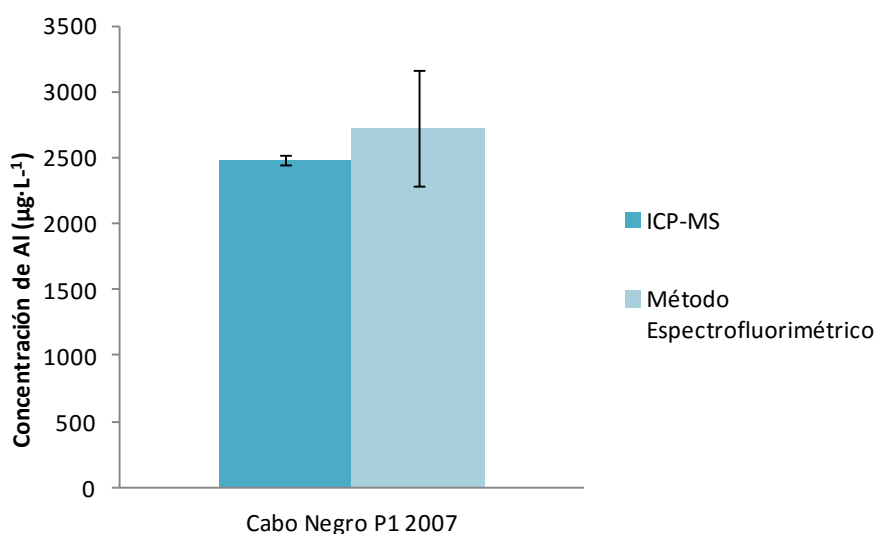


Figura 27. Concentración analizada frente a la concentración con el método de referencia.

- Precisión

En este caso, se prepararon distintas réplicas en las condiciones óptimas; para la repetibilidad se prepararon 8 réplicas en un mismo día y para el estudio de reproducibilidad se prepararon 8 réplicas adicionales cada día en otros dos días diferentes (24 réplicas en total). Los resultados se recogen en la tabla 11 y tabla 12.

**Tabla 11. Estudio de la repetibilidad del método.**

Al	
Réplica	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
1	114,30
2	116,43
3	115,47
4	109,72
5	117,55
6	111,54
7	118,44
8	111,37
Media	114,35
Sd	3,18
RSD (%)	2,78

**Tabla 12. Estudio de la reproducibilidad del método.**

Al				
	Día 1	Día 2	Día 3	
Réplica	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
1	113,82	110,28	114,30	$112,8 \pm 2,196$
2	113,66	111,26	116,43	$113,78 \pm 2,587$
3	122,44	118,92	115,47	$118,94 \pm 3,485$
4	119,67	110,71	109,72	$113,37 \pm 5,481$
5	119,09	119,75	117,55	$118,79 \pm 1,129$
6	113,00	121,49	111,54	$115,34 \pm 5,373$
7	112,11	120,45	118,44	$117 \pm 4,352$
8	112,36	119,23	111,37	$114,32 \pm 4,281$

**Cont. Tabla 12. Estudio de la reproducibilidad del método.**

Al				
	Día 1	Día 2	Día 3	
Réplica	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Media	----	----	----	115,54
Sd	----	----	----	3,611
RSD (%)	----	----	----	3,125

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que el método desarrollado presenta en ambos estudios un  $\text{RSD} < 5\%$ .

#### 4.4.5. Límite de Detección y Cuantificación

Para llevar a cabo ambas medidas se emplea el criterio habitual de realizar diez medidas independientes del blanco para tener una mayor aproximación a la dispersión de los resultados ofrecidos por el método. El valor del blanco con su desviación estándar y los parámetros de calibración empleados para el cálculo del límite de detección y cuantificación se muestran en la tabla 13 y tabla 14:

Aplicando las expresiones de límite de detección y cuantificación (Ecuación 7 y 8), se ha conseguido obtener un valor de LOD de  $2,72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y un valor de LOQ de  $9,06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , siendo ambos límites suficientes para realizar los análisis de este metal en las muestras de digeridos de moluscos del litoral marroquí.

**Tabla 13. Media del Blanco y su desviación estándar.**

	Señal de Fluorescencia (u.a.)
Media Blanco	8,46
SD	0,311

**Tabla 14. Parámetros a emplear para el cálculo de LOD y LQD.**

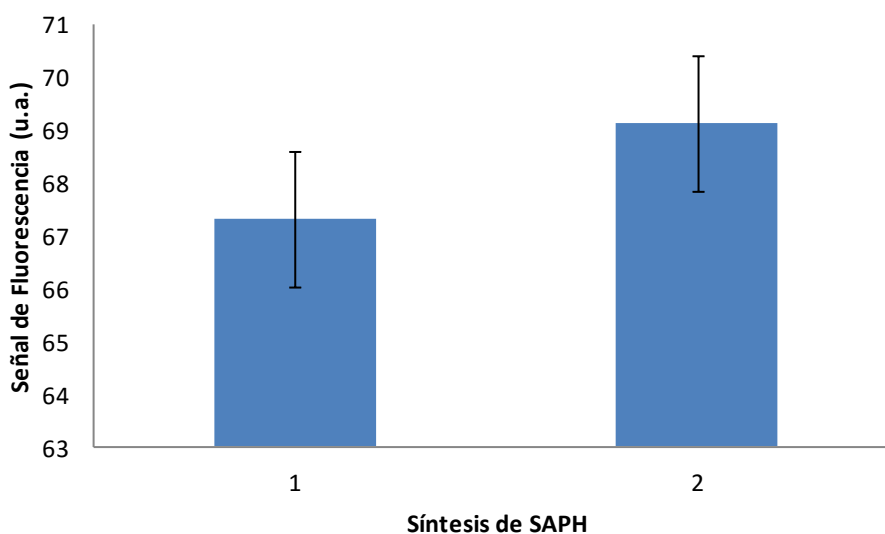
Al		
$S_b$	m	$R^2$
0,311	0,3438	0,9968

#### 4.4.6. Sensibilidad

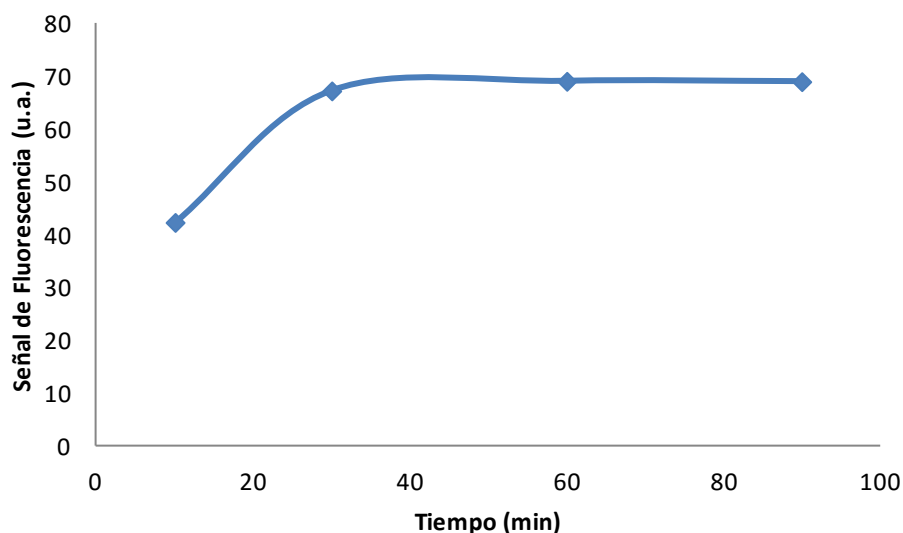
Cuando se trabaja en el intervalo lineal de un método, se puede decir que la sensibilidad se corresponde con la pendiente de la curva de calibrado [68], siendo en nuestro caso un método muy sensible para la determinación de Al ( $0,3699 \text{ L} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ).

#### 4.4.7. Robustez

En el primero estudio, empleando SAPH sintetizado en dos fechas diferentes, se puede decir que la señal de fluorescencia obtenida para una misma muestra de digerido de molusco es independiente del SAPH empleado, siempre y cuando éste se haya sintetizado con el procedimiento establecido en materiales y métodos (Figura 28). En el segundo estudio, realizando las medidas a diferentes tiempos tras su preparación, se puede observar que a partir del minuto 30 la señal de fluorescencia se mantiene constante, lo que hace indicar que a partir de ese tiempo de reacción el sistema Al(III)-SAPH en medio acetato se mantiene estable al menos durante 12 horas (Figura 29) [10]. Tras los resultados obtenidos, se puede decir que es un método robusto.



**Figura 28. Señal de Fluorescencia (u.a.) estudiada para la misma muestra digerida, a partir del reactivo SAPH, sintetizado en dos fechas diferentes; 1. Octubre 2015; 2. Abril 2016**



**Figura 29.** Señal de Fluorescencia (u.a.) estudiada para la misma muestra a diferentes tiempos tras su preparación.

#### 4.4.8. Análisis de recuperación

Una forma sencilla y de bajo coste de realizar este tipo de análisis es mediante la adición de una cantidad conocida de patrón puro a muestras con matrices reales [68].

En la tabla 15 se recogen los resultados que se obtuvieron de nuestro estudio, siendo en todos los casos los porcentajes de recuperación obtenidos válidos por la Environmental Protection Agency (EPA), (80 % - 120 %) [69].

**Tabla 15.** Resultados análisis de recuperación.

Callista Chione			
Al			
Muestra	C <sub>Al</sub>	C <sub>Al</sub> + 60 ppb Al	Recuperación (%)
1	100,61	159,95	98,89
2	46,47	98,08	86,02
3	67,52	128,26	101,21
Promedio	----	----	95,38 ± 0,08

#### 4.4.9. Incertidumbre

La incertidumbre debe recoger todos y cada uno de los factores que puedan ocasionar variabilidad en los datos obtenidos aplicando el método en cuestión, de manera que cada uno de

los pasos y procesos llevados a cabo a la hora de realizar el proceso analítico son fuente de incertidumbre [70].

- Identificación de los focos de incertidumbre

El objetivo fundamental de este paso es identificar los puntos del proceso analítico que son susceptibles de aportar incertidumbre al resultado.

Algunos de los principales efectos que se deben considerar son: condiciones de almacenamiento, instrumentación, pureza de los reactivos, condiciones de medida, efectos de la muestra, efectos debido al analista y efectos aleatorios.

Para estudiar el aporte de cada fuente de incertidumbre, es necesario que el procedimiento esté perfectamente definido, para de esta forma poder reproducirlo [50]. En nuestro caso se podría dividir en varias etapas:

Reguladora Acético/Acetato 0,9 M: En primer lugar se prepara una disolución reguladora 3 M, para la que se añade 17,19 mL de ácido acético ( $C_{\text{Acético}}$ ) en una probeta ( $V_{\text{probeta}}$ ) y adicionando  $\text{NH}_3$  hasta ajustar el pH. Finalmente dicha disolución se lleva a un matraz de 100 mL ( $V_{100}$ ). De esta disolución se pipetea 1,5 mL ( $V_{\text{micro}}$ ) y se llevan a un volumen de 5 mL ( $V_{\text{Bote}}$ ).

Volumen de Etanol a adicionar: Volumen adicionado con la micropipeta ( $V_{\text{micro}}$ ).

SAPH 3 mM: Se prepara una disolución SAPH de 20 mM, para ello se pesan 0,4824 g (Balanza) en 100 ml de Etanol que se llevan a un matraz ( $V_{100S}$ ). De esta disolución se pipetea 0,75 mL y se lleva a un volumen de 5 mL ( $V_{\text{Bote}}$ ).

Volumen de Muestra a adicionar: Volumen adicionado con la micropipeta ( $V_{\text{micro}}$ ).

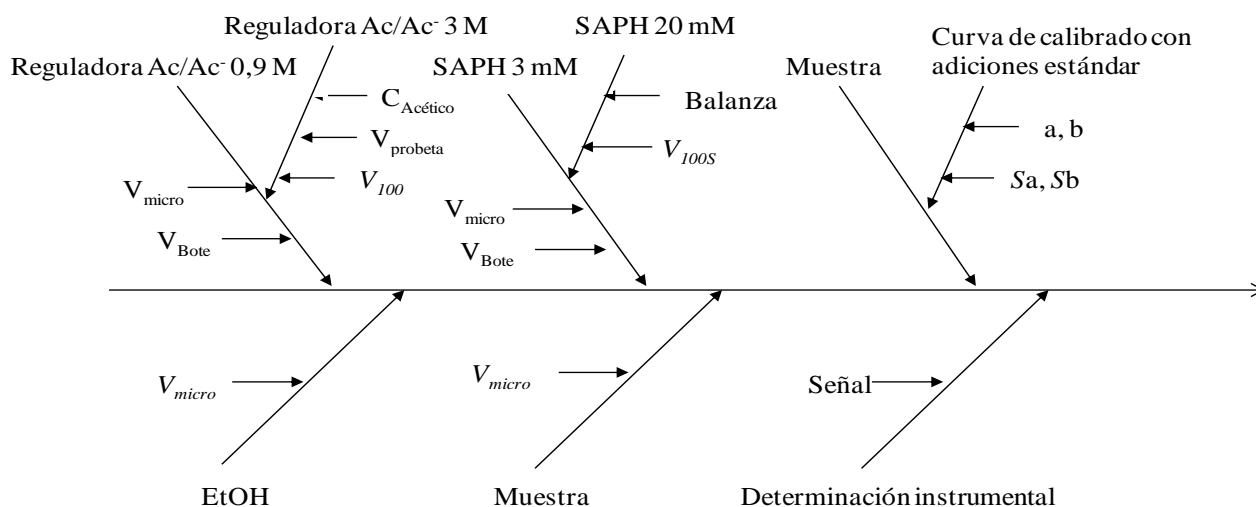
Determinación de la concentración de Al a través de la curva de calibración con adiciones estándar: Para ello se preparan una serie de patrones con la muestra objeto de estudio añadiendo en orden creciente cantidades conocidas de aluminio. Para determinar la concentración de aluminio se iguala a 0 la ecuación de la recta,  $y = a \cdot x + b$ , de manera que la incertidumbre para cada muestra vendrá determinada por  $S_a$  y  $S_b$  [71].

Determinación instrumental: Consiste en registrar la señal ofrecida por las muestras tras el proceso de preparación y análisis en el espectrofluorímetro. Siendo  $S$  la señal para cada una de las muestras medidas.

Expresión de los resultados: Aplicando el método de las adiciones estándar y la extrapolación, se ha calculado la concentración de aluminio en las muestras.



A continuación se muestra el diagrama de propagación de la incertidumbre a lo largo del proceso analítico descrito (Figura 31):



**Figura 30. Diagrama causa-efecto de propagación de la incertidumbre.**

- Cuantificación de la incertidumbre en cada etapa del análisis

Una vez se han identificado los posibles focos de incertidumbre, el siguiente paso es cuantificar su aporte (Tabla 16). Para ello se determina la incertidumbre estándar correspondiente a cada etapa del método. Una vez cuantificadas se calculará la incertidumbre combinada a través de la ecuación 1 y la incertidumbre expandida a través de la ecuación 2.

**Tabla 16. Incertidumbre estándar de cada una de las fuentes identificadas.**

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$
$C_{Acético}$	$mol \cdot L^{-1}$	6	0,0045
$V_{probeta}$	L	0,05	0,009
$V_{100}$	L	0,1	0,001
$V_{micro}$	L	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0,0027
$V_{Bote}$	L	0,005	0,018
$V_{micro}$	L	$1,75 \cdot 10^{-3}$	$5,25 \cdot 10^{-6}$
<b>Balanza</b>	g	0,48249	0,01
$V_{100S}$	L	0,1	0,0001
$C_{20mM}$	$g \cdot L^{-1}$	4,8249	0,015
$V_{micro}$	L	$7,5 \cdot 10^{-4}$	0,0029
$V_{Bote}$	L	0,005	0,014

Cont. Tabla 16. Incertidumbre estándar de cada una de las fuentes identificadas.

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$
$V_{micro}$	L	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-6}$
$a_{Cabo Negro P1 2007}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,2304	0,011
$b_{Cabo Negro P1 2007}$	u.a.	68,327	0,281
$a_{Cabo Negro P1 2008}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,2615	0,001
$b_{Cabo Negro P1 2008}$	u.a.	50,371	1,196
$a_{Martil P1 2008}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,2195	0,019
$b_{Martil P1 2008}$	u.a.	36,315	0,047
$a_{Oued Laou P1 2007}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,1985	0,020
$b_{Oued Laou P1 2007}$	u.a.	64,555	1,255
$a_{Oued Laou P1 2008}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,1788	0,001
$b_{Oued Laou P1 2008}$	u.a.	49,594	0,285
$a_{Djaouen P1 2008}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,2595	0,042
$b_{Djaouen P1 2008}$	u.a.	57,237	0,646

- Cálculo de la incertidumbre combinada y expandida

Una vez se ha obtenido la contribución individual de cada uno de los focos de incertidumbre, expresada como  $u_s$ , hay que combinarlas mediante la ley de propagación de la incertidumbre para poder calcular la  $u_c$  [70]. Este cálculo puede ser simplificado utilizando el método de Kragten.

- Incertidumbre de la reguladora Acético/Acetato 0,9 M

La ecuación del modelo para el cálculo de la incertidumbre de esta etapa responde a dos diluciones sucesivas (Ecuación 12) (Tabla 17):

$$C_{0,9 \text{ mol} \cdot L^{-1}} = C_{Acético} \cdot \left( \frac{V_{Probeta}}{V_{100}} \right) \cdot \left( \frac{V_{micro}}{V_{Bote}} \right)$$

Ecuación 12. Cálculo de la incertidumbre de la reguladora.

Tabla 17. Incertidumbre debida a la Reguladora Acético/Acetato 0,9 M.

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$
$C_{Acético}$	$mol \cdot L^{-1}$	6	0,0045
$V_{Probeta}$	L	0,05	0,009
$V_{100}$	L	0,1	0,001

Cont. Tabla 187. Incertidumbre debida a la Reguladora Acético/Acetato 0,9 M.

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	
$V_{\text{micro}}$	L	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0,0027	
$V_{\text{Bote}}$	L	0,005	0,018	
$C_{0,9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>0,9</b>	$u_c$	<b>0,02</b>

- Incertidumbre volumen de etanol

El volumen a adicionar de etanol es de 1,75 mL a través de una micropipeta con un RSD (%) de 0,3 (Tabla 18).

Tabla 18. Incertidumbre debida al volumen de etanol.

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	
$V_{\text{micro}}$	L	$1,75 \cdot 10^{-3}$	$5,25 \cdot 10^{-6}$	
$V_{\text{Etanol}}$	L	<b><math>1,75 \cdot 10^{-3}</math></b>	$u_c$	<b><math>5,25 \cdot 10^{-6}</math></b>

- Incertidumbre de SAPH 3 mM

La ecuación del modelo para el cálculo de la incertidumbre de esta etapa se corresponde con las siguientes ecuaciones (Ecuación 13 y Ecuación 14) (Tabla 19):

$$C_{20 \text{ mM}} = \left( \frac{\text{Balanza}}{V_{100S}} \right)$$

Ecuación 13. Cálculo de la incertidumbre para la concentración de 20 mM.

$$C_{3 \text{ mM}} = \frac{C_{20 \text{ mM}} \cdot V_{\text{micro}}}{V_{\text{Bote}}}$$

Ecuación 14. Cálculo de la incertidumbre para la concentración de 3 mM.

Tabla 19. Incertidumbre debida al SAPH 3 mM.

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	
<b>Balanza</b>	G	0,48249	0,01	
$V_{100S}$	L	0,1	0,0001	
$C_{20\text{mM}}$	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	4,8249	0,015	
$V_{\text{micro}}$	L	$7,5 \cdot 10^{-4}$	0,0029	
$V_{\text{Bote}}$	L	0,005	0,014	
$C_{3\text{mM}}$	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>0,7237</b>	$u_c$	<b>0,02</b>

- Incertidumbre volumen de muestra

El volumen a adicionar de Muestra es de 0,5 mL a través de una micropipeta con un RSD (%) de 0,4 (Tabla 20).

**Tabla 20. Incertidumbre debida al volumen de Muestra.**

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	
$V_{\text{micro}}$	L	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-6}$	
$V_{\text{Etanol}}$	L	$5 \cdot 10^{-4}$	$u_c$	$2 \cdot 10^{-6}$

- Incertidumbre de la muestra a partir de la curva de calibración con adiciones estándar

La ecuación del modelo para el cálculo de la incertidumbre de esta etapa viene dado por (Ecuación 15 y 16):

$$C_{Al} = \frac{b}{a} \cdot 10^*$$

**Ecuación 15. Cálculo de la concentración de aluminio en la muestra**

\* Se multiplica por 10 porque la muestra de digerido de molusco presentaba una dilución 1:10 en el recipiente en el que se adicionaba.

$$U_c = \sqrt{\left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_a}{a}\right)^2} \cdot C_{Al}$$

**Ecuación 16. Cálculo de la incertidumbre de la muestra a partir de la curva de calibración con adiciones estándar**

**Tabla 21. Incertidumbre debida a la curva de calibración con adiciones estándar.**

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	
$a_{\text{Cabo Negro P1 2007}}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,2304	0,011	
$b_{\text{Cabo Negro P1 2007}}$	u.a.	68,327	0,281	
$C_{Al}$	$\mu g \cdot L^{-1}$	2965,6	$u_c$	<b>142,1</b>
$a_{\text{Cabo Negro P1 2008}}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,2615	0,001	
$b_{\text{Cabo Negro P1 2008}}$	u.a.	50,371	1,196	
$C_{Al}$	$\mu g \cdot L^{-1}$	1926,2	$u_c$	<b>46,3</b>
$a_{\text{Martil P1 2008}}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,2195	0,019	
$b_{\text{Martil P1 2008}}$	u.a.	36,315	0,047	

**Cont. Tabla 22. Incertidumbre debida a la curva de calibración con adiciones estándar.**

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	
$C_{Al}$	$\mu g \cdot L^{-1}$	1654,4	$u_c$	143,2
$a_{Oued\ Laou\ P1\ 2007}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,1985	0,020	
$b_{Oued\ Laou\ P1\ 2007}$	u.a.	64,555	1,255	
$C_{Al}$	$\mu g \cdot L^{-1}$	3252,1	$u_c$	333,7
$a_{Oued\ Laou\ P1\ 2008}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,1788	0,001	
$b_{Oued\ Laou\ P1\ 2008}$	u.a.	49,594	0,285	
$C_{Al}$	$\mu g \cdot L^{-1}$	2773,7	$u_c$	22,2
$a_{Djaouen\ P1\ 2008}$	$L \cdot \mu g^{-1}$	0,2595	0,042	
$b_{Djaouen\ P1\ 2008}$	u.a.	57,237	0,646	
$C_{Al}$	$\mu g \cdot L^{-1}$	2205,7	$u_c$	357,9

A partir de las incertidumbres estándar de cada una de los focos de incertidumbre se determinó la incertidumbre combinada de cada etapa del método a través de la ecuación 1, pudiendo de esta manera calcular la incertidumbre combinada del método (Ecuación 17). A modo de ejemplo, la incertidumbre combinada de la medida de la muestra Cabo Negro P1 2007 es de  $2494,73 \pm 141,10 \mu g \cdot L^{-1} Al$ .

$$u_{CT}^2 = u_{creguladora}^2 + u_{cetanol}^2 + u_{CSAPH}^2 + u_{cmuestra}^2 + u_{cadicionesestandard}^2$$

#### **Ecuación 17. Cálculo de la incertidumbre combinada del método.**

Conocida la incertidumbre combinada del método se calculó la incertidumbre expandida,  $U$ , a través de la ecuación 2, donde el factor de cobertura,  $k$ , es igual a 2, obteniéndose para la muestra Cabo Negro P1 2007 el siguiente resultado  $2494,73 \pm 284,20 \mu g \cdot L^{-1} Al$ .

Para el resto de muestras seleccionadas el cálculo se realiza del mismo modo.

#### **4.5. Aplicación a muestras de *Callista Chione***

Una vez desarrollado y validado el método espectrofluorimétrico y obtenidas las condiciones óptimas donde la señal de fluorescencia es máxima, es necesario demostrar su aplicabilidad al análisis de muestras reales.

Estas muestras de moluscos fueron tomadas durante un muestreo realizado por otros compañeros del grupo de investigación en los años 2007 y 2008. Una vez las muestras fueron recogidas, se llevaron al laboratorio, donde se les realizó el procedimiento de liofilización y digestión descrito en el apartado de materiales y métodos.

De todos los digeridos, se seleccionaron varios de ellos correspondientes a los puntos 1 de cada zona de muestreo. Estas muestras fueron analizadas a través de un método de referencia ICP-MS y por el nuevo método, para determinar de esta manera si los resultados obtenidos son comparables (Tabla 22).

Para medir en el ICP-MS se preparó una recta de calibrado con una serie de patrones acuosos con concentraciones de aluminio de forma creciente (Anexo 4). Siendo los patrones a preparar los siguientes:  $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $600 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $7000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $10000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; y de esta forma determinar la concentración de aluminio presente en nuestras muestras. Una vez obtenida la recta, los botes con las muestras seleccionadas se llevaban directamente al equipo y sin necesidad de realizar ninguna preparación previa, se analizó cuantitativamente el aluminio presente en las mismas. Por otro lado, para medir la concentración de aluminio en las muestras a través del nuevo método se procedió a preparar las disoluciones de la misma forma que para los estudios anteriores (descrita en el apartado 3.3. de Material y Métodos), empleando las condiciones óptimas. En tabla 22, se puede observar que entre los resultados obtenidos por ambos métodos el error relativo obtenido en todos los casos es inferior al 5 %.

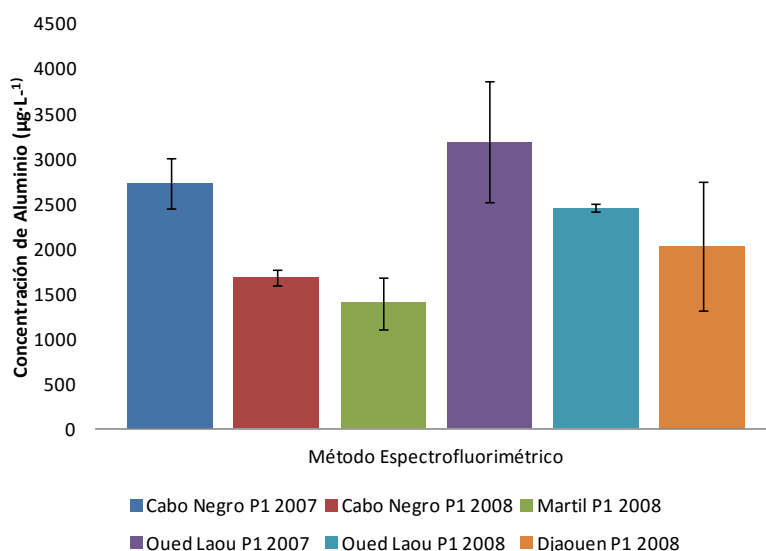
**Tabla 22. Comparación de la concentración de aluminio medida por ambos métodos.**

Muestra	Método de Referencia ICP-MS	Método Propuesto ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al)	Error Relativo (%)
Cabo Negro P1 2007	$2483 \pm 38,47$	$2494,73 \pm 284,20^*$	0,432
Cabo Negro P1 2008	$1392 \pm 33,58$	$1455,39 \pm 92,60^*$	4,479
Martil P1 2008	$1146 \pm 37,55$	$1183,59 \pm 286,40^*$	3,191
Oued Laou P1 2007	$2798 \pm 93,41$	$2781,29 \pm 667,40^*$	-0,632
Oued Laou P1 2008	$2264 \pm 49,74$	$2302,87 \pm 44,40^*$	-1,672
Djaouen P1 2008	$1703 \pm 44,05$	$1734,82 \pm 715,80^*$	1,809

\* Incertidumbre expandida (U).

En la figura 31 se puede ver que para las muestras que se tomaron en la expedición de 2007 los valores de concentración de aluminio salen bastante más altos que para las muestras de la expedición de 2008, esto puede ser causa de una contaminación puntual que tuviese lugar en las zonas de muestreo de Cabo Negro y Oued Laou en el año 2007, haciendo que la concentración de aluminio fuese más alta de lo normal.

De manera que a causa de esta posible contaminación existe una gran diferencia entre el valor de aluminio obtenido en los puntos de muestreo en el año 2007 y el valor de aluminio obtenido en los puntos de muestreo en el año 2008.



**Figura 31. Comparación de la concentración de aluminio en las diferentes muestras.**

De acuerdo a los estudios existentes en bibliografía [27,72] sobre la concentración de aluminio en diferentes especies de moluscos, los resultados obtenidos en nuestro estudio se encuentran dentro de los valores considerados normales, que van desde  $130 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $6000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  aproximadamente. Estos valores comparados con los de Provisional Tolerable Daily Intake (PTDI), de 1 mg de aluminio por kg de peso corporal por día según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [73] indica que el contenido de aluminio presente en la especie estudiada no supone una proporción significativa para la ingesta diaria de aluminio por los humanos.

Por otra parte, en la figura 31 y la tabla 22 se puede observar que el punto de muestreo donde la concentración de aluminio es mayor es en Oued Laou P1 2007, donde las dos actividades que se desarrollan son la agricultura intensiva y la pesca artesanal. En la agricultura intensiva, el posible empleo de pesticidas compuestos por aluminio como el fosforo de aluminio, también conocido como ferrero fosforo, puede provocar su acumulación en los sedimentos. Además el empleo de este tipo de pesticidas puede provocar un aumento de la acidez del suelo, favoreciendo la solubilidad del  $\text{Al}^{3+}$  en el mismo y como consecuencia su acumulación en organismos filtradores [74]. Por otro lado, en la pesca artesanal el empleo de materiales fabricados con este metal, también puede provocar la contaminación del sedimento y su acumulación en dichos organismos.

La relación de los pesticidas con enfermedades como Parkinson y Alzheimer, hacen visible la importancia del estudio del aluminio en diferentes organismos filtradores que se encuentran dentro de la dieta del ser humano.

#### 4.6. Comparación del método propuesto para la determinación de aluminio en moluscos con otros métodos encontrados en la bibliografía

El método propuesto se ha comparado con otros métodos de la bibliografía donde se han realizado estudios similares con diferentes técnicas. Determinación de aluminio en el tejido comestible del molusco *Arca zebra* empleando como técnica ICP-AES [75], determinación de aluminio en *Mytilus galloprovincialis* empleando como técnica ICP-MS [27], determinación de aluminio en *Chamalea gallina* y *Donax trunculus* empleando como técnica ICP-MS [72]. En todos ellos se puede observar que los límites de detección obtenidos son más bajos que en nuestro caso, pero las técnicas empleadas son más costosas. Por tanto, nuestro método a pesar de presentar un límite de detección superior, es adecuado y suficiente para la determinación de aluminio en moluscos, además de presentar la ventaja de ser un método bastante más económico que los anteriores.



## 5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Las variables que presentan efectos significativos sobre la señal de fluorescencia del complejo Al(III)-SAPH son: el pH, la concentración de reguladora, el porcentaje de etanol y las interacciones pH-pH, pH-reguladora y pH-etanol. Esto pone de manifiesto la importancia del uso de un método de optimización multivariante, resultando las condiciones óptimas las siguientes: pH 6,64; reguladora 0,9 M, SAPH 3 mM y 50 % etanol.
- Se ha validado el método espectrofluorimétrico siguiendo las especificaciones de la ISO 17025 obteniéndose la incertidumbre asociada a las medidas, además de unos buenos resultados en cuanto a sensibilidad, robustez, precisión, intervalo lineal y porcentaje de recuperación, así como unos buenos límites de detección y cuantificación, lo que nos ha permitido verificar la validez del método empleado y estudiado.
- Se puede comprobar que los resultados de la concentración de aluminio obtenida a través de nuestro método, están en concordancia con los obtenidos por el método empleado como referencia ICP-MS.
- Se ha demostrado la aplicabilidad del método a muestras reales obteniendo resultados satisfactorios, de donde se ha podido ver que las muestras digeridas de moluscos que presentan una mayor cantidad de aluminio son las que se encuentran en la zona de Oued Laou, zona que se caracteriza por la agricultura intensiva y la pesca artesanal.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.P. Xavier Domènech, Química Ambiental de sistemas terrestres, 2006.
- [2] D. Adriano, Trace elements in the terrestrial environment, Springer Verlag., New York, 1986.
- [3] S. Levin, Encyclopedia of Biodiversity, 2<sup>a</sup> edition, Ed. Academic Press, 2001.
- [4] P. Aggett, G.F. Nordberg, M. Nordberg, Essential Metals: Assessing Risks from Deficiency and Toxicity, Fourth Edi, Elsevier, 2014.
- [5] Sandra Santiago Rivas, Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotionelinas en muestras de mejillón. Universidad Santiago de Compostela.
- [6] J.E. Sánchez Uría, A. Sanz-Medel, Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples, Talanta. 47 (3) (1998) 509–524.
- [7] CCME, Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Introduction. Updated. Environmental quality guideline development process, (1999) 2001.
- [8] E. D. McLean, Commun Sci. Sci. Planr. Anal. 7 (1976) 619.
- [9] J.I. Mujika, J.M. Ugalde, X. Lopez, Aluminum speciation in biological environments. The deprotonation of free and aluminum bound citrate in aqueous solution., Phys. Chem. Chem. Phys. 14 (2012) 12465–75.
- [10] M.P. Manuel-Vez, M. Garcia-Vargas, Talanta 41 (1994) 1553-1559.
- [11] R.W. Smith, Kinetic aspects of aqueous aluminum chemistry: environmental implications, Coord. Chem. Rev. 149 (1996) 81–93.
- [12] R.T. Hidalgo, La exposición al aluminio y su relación con el ambiente y la salud Exposure to aluminum and its relationship between environment and health, (2013).
- [13] Totten, G. E. & MacKenzie, Handbook of Aluminum: Alloy Production and Materials Manufacturing, Volumen 2, CRC Press, New York, USA, 2003.
- [14] ATSDR, Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs22.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs22.html) (Consultado 21/06/2016).
- [15] Loreto Suay Llopis y Ferran Ballester Díez, REVISIÓN DE LOS ESTUDIOS SOBRE

- EXPOSICIÓN AL ALUMINIO Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, *Rev Esp Salud Pública* 2002; 76: 645-658
- [16] P.D.L. Lima, M.C. Vasconcellos, R.C. Montenegro, M.O. Bahia, E.T. Costa, L.M.G. Antunes, R.R. Burbano, Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: a review of the literature., *Hum. Exp. Toxicol.* 30 (10) (2011) 1435–1444.
- [17] J. Poirier, H. Semple, J. Davies, R. Lapointe, M. Dziwenka, M. Hiltz, D. Mujibi, Double-blind, vehicle-controlled randomized twelve-month neurodevelopmental toxicity study of common aluminum salts in the rat, *Neuroscience*. 193 (2011) 338–362.
- [18] H. Erazi, S. Ahboucha, H. Gamrani, Chronic exposure to aluminum reduces tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and locomotor performance in rats, *Neurosci. Lett.* 487 (2011) (1) 8–11.
- [19] G. Berthon, Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity, *Coord. Chem. Rev.* 228 (2002) 319–341.
- [20] V.B. Gupta, S. Anitha, M.L. Hegde, L. Zecca, R.M. Garruto, R. Ravid, S.K. Shankar, R. Stein, P. Shanmugavelu, K.S. Jagannatha Rao, Aluminium in Alzheimer's disease: Are we still at a crossroad?, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 143–158.
- [21] L. Cunat, M.C. Lanhers, M. Joyeux, D. Burnel, Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats: effects of aluminum compounds and some dietary constituents., *Biol. Trace Elem. Res.* 76 (2000) 31–55.
- [22] X. Wu, J. Li, J.N. Hu, Z.Y. Deng, The effects of glutamate and citrate on absorption and distribution of aluminum in rats, *Biol. Trace Elem. Res.* 148 (2012) 83–90.
- [23] K. Nagasawa, J. Akagi, M. Koma, T. Kakuda, K. Nagai, S. Shimohama, S. Fujimoto, Transport and toxic mechanism for aluminum citrate in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Life Sci.* 79 (1) (2006).
- [24] A. Pérez, G., Vittori, D., Garbossa, G. & Nesse, Aluminum toxicity in erythropoiesis: related mechanisms., *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 36 (1) (2002) 41–50.
- [25] E. Rezabal, J.M. Mercero, X. Lopez, J.M. Ugalde, Protein Side Chains Facilitate Mg/Al Exchange in Model Protein Binding Sites, *ChemPhysChem*. 8 (2007) 2119–2124.
- [26] J.L. Cervera, Principales linajes de los Lofotrocozoos (II) Moluscos y Anélidos, *Zoología*. (2011).

- [27] M. Belivermis, Ö. Kılıç, Y. Çotuk, Chemosphere 144 (2016) 1980–1987.
- [28] P.S. Rainbow, Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment, Mar. Pollut. Bull. 31 (4) (1995) 183–192.
- [29] S. Topcuoğlu, Ç. Kirbaşoğlu, N. Güngör, Heavy metals in organisms and sediments from Turkish coast of the Black Sea, 1997-1998, Environ. Int. 27 (7) (2001) 521–526.
- [30] V. Besada, J. Manuel Andrade, F. Schultze, J. José González, Monitoring of heavy metals in wild mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast, Cont. Shelf Res. 31(5) (2011) 457–465.
- [31] A. Çayır, M. Coşkun, M. Coşkun, Evaluation of metal concentrations in mussel *M. galloprovincialis* in the Dardanelles strait, Turkey in regard of safe human consumption, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89 (2012) 91–95.
- [32] E. Strogyloudi, M.O. Angelidis, A. Christides, E. Papathanassiou, Metal concentrations and metallothionein levels in *Mytilus galloprovincialis* from Elefsis bay (Saronikos gulf, Greece), Environ. Monit. Assess. 184 (12) (2012) 7189–7205.
- [33] Ö. Kılıç, M. Belivermiş, Spatial and seasonal distribution of trace metal concentrations in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and sediment of Bosphorus and Golden Horn., Bull. Environ. Contam. Toxicol. 91 (2013) 402–8.
- [34] C.N. Ferrarello, M. del R.F. de la Campa, J.F. Carrasco, A. Sanz-Medel, Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel *Mytilus edulis* by orthogonal separation mechanisms with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: effect of selenium administration, Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 57 (2002) 439–449.
- [35] Walsh, A.R., y O'Halloran, J. (1998). Accumulation of chromium by a population of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to leather tannery effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 1429-1438.
- [36] GALINDO, S. (2015) Comparación de los contenidos totales en moluscos y sedimentos del litoral marroquí. Trabajo de fin de grado.
- [37] Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortín, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneult, B., (2002). *Metal bioavailability to phytoplankton. Applicability of the biotic ligand model*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 133, 189 - 206.
- [38] Nordberg, M., Templeton, D.M., Andersen, O., Duffus, J.H. (2009). *Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009)*. Pure and Applied Chemistry

81, 829-970.

- [39] M. Stoeppler (Ed.), Hazardous Metals in the Environment, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1992.
- [40] Skoog et al.'s Principios de Análisis Instrumental (5ta Edición). Madrid. McGraw-Hill.
- [41] Lakowicz, J.R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition. Springer US. ISBN: 978-0-387-46312-4.
- [42] M.P. Manuel-Vez, Determinaciones espectrofluorimétricas de aluminio (III) y titanio (IV) y espectrofotométricas simultáneas de hierro (II), cobalto (II) y níquel (II) con picolinoilhidrazonas: caracterización de suelos agrícolas de la "Almoraima". (Tesis Doctoral) (Cádiz), Universidad de Cádiz, 1990.
- [43] M.P. Manuel- Vez, C. Moreno, D.J. Gonzalez, M. Garcia- Vargas, Direct fluorimetric determination of dissolved aluminum inseawater at nanomolar levels, Anal. Chim. Acta. 355(2-3) (1997) 157–161.
- [44] Arnau Garau, Miquel Oliver, María Rosende, Manuel P. Mánuel-Vez, Manuel Miró, Talanta 133(2015)120–126.
- [45] G. Albendín, M.P. Manuel-Vez, C. Moreno, M. García-Vargas, Talanta 60 (2003) 425\_ 431.
- [46] S.W. L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wilstrom, Design of experiments. Principles and applications, Umetrics AB, 2008.
- [47] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brand~ao, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, W.N.L. dos Santos, Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, Analytica Chimica Acta 597 (2007) 179–186.
- [48] D. Montgomery, Diseño y análisis de experimentos, Limusa Wiley. (2004) 21–692.
- [49] José Antonio López López, Interacción atmósfera-hidrosfera: incidencia de los aportes atmosféricos y fluviales en la zona de influencia mareal del río Guadalquivir y estudio de la especiación química de contaminantes (Tesis Doctoral), Universidad de Cádiz, 2010.
- [50] A. Maroto, J. Riu, R. Boqué, F. Xavier Rius, Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process, Anal. Chim. Acta. 391 (1999) 173–185.

- [51] J.M.V. Baptista, Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica, Universitat Autònoma de Barcelona, 2001.
- [52] Joint Committee For Guides In Metrology (JCGM), International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM), VIM3 Int. Vocab. Metrol. 3 (2008) 104.
- [53] O. Magnusson, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2014.
- [54] Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito ( UNODC), Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos, Naciones Unidas, Nueva York, 2010.
- [55] L. Huber, Validation of Computerized Analytical Systems, Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, IL, 1996.
- [56] R.S. Galen y S.R. Gambino, Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses, John Wiley & Sons, Nueva York, 1975.
- [57] J.M. Miller, J.C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 2010.
- [58] P. Grammaticakis, Bull. Soc. Chim. (1955).
- [59] ICTIOTERM, Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía, (2013). <http://www.ictioterm.es> (Consultado 13/06/2016).
- [60] M. Benomar, Etat de la contamination des côtes ouest de la Méditerranée marocaine par les métaux lourds frange littorale M'diq-Djaouen (Tesis doctoral), Abdelmalek Essaadi, 2010.
- [61] M. Benomar, (2010). Implementación de sistemas de separación química para la determinación de metales pesados en ecosistemas marinos (Tesis doctoral). Universidad de Cádiz, Cádiz.
- [62] M. Benomar, C. Mendiguchía, H. Er-raioui, M. Marhraoui, G. Lafraoui, M.K. Oulad-abdellah, M. García-vargas, C. Moreno, Analysis of Heavy Metals in Sediments from Northern Moroccan Coast Using Simple and Low-Cost Methodology, Open Environ. Pollut. Toxicol. J. 3 (2012) 47–54.
- [63] M. Ben Omar, C. Mendiguchía, H. Er-Raioui, M. Marhraoui, G. Lafraoui, M.K. Oulad-

- Abdellah, M. García-Vargas, C. Moreno, Distribution of heavy metals in marine sediments of Tetouan coast (North of Morocco): natural and anthropogenic sources, *Environ. Earth Sci.* 74 (2015) 4171–4185.
- [64] P. Vankeerberghen, J. Smeyers-Verbeke, The quality coefficient as a tool in decisions about the quality of calibration in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 15 (1992) 195–202.
- [65] A. Maroto, R. Boqué, J. Riu, F.X. Rius, Effect of non-significant proportional bias in the final measurement uncertainty, *Analyst.* 128 (2003) 373–378.
- [66] D.B. Hibbert, Systematic errors in analytical measurement results, *J. Chromatogr. A.* 1158 (2007) 25–32.
- [67] DIPRES, Notas técnicas, Gob. Chile, Minist. Hacienda, DIPRES,- Div. Control Gestión. (2009).
- [68] International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms ( VIM ) 3 rd edition Final draft 2006-08-01 Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés ( VIM ) 3 e édition Projet f, (2006) 1–127.
- [69] [www.epa.gov/reg3hscd/bf-lr/regional/analytical/metals.htm](http://www.epa.gov/reg3hscd/bf-lr/regional/analytical/metals.htm).
- [70] Citac, Eurachem, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, English. 2nd (2000) 126.
- [71] M. A. Dosal, M. Villanueva, Introducción a la Metrología química, Curvas de Calibración en los métodos analíticos, (2008).
- [72] Ö. Özden, N. Erkan, M.C. Deval, Trace mineral profiles of the bivalve species *Chamelea gallina* and *Donax trunculus*, *Food Chem.* 113 (2009) 222–226.
- [73] Joint FAO/WHO expert committee (1999). Expert committee on food additives. In summary and conclusions, 53rd meeting, Rome (1-10 June).
- [74] M. Toneatti, N.R. Rivera, Aluminum Tolerance Assays of *Bromus stamineus* and *Bromus lithobius* from Southern Chile, *AGRONOMIA.* (2005) 9–17.
- [75] H. Metal, D. In, E. Tissue, O.F. The, C. In, N. Esparta, Determinación de metales pesados en el tejido comestible del molusco *Arca zebra* comercializado en el estado de Nueva Esparta, *VENEZUELA*, 22 (2010) 141–148.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Anexo 1

#### Preparación de disoluciones

- **Disolución Reguladora Acético/Acetato 2 M**

Se prepara la disolución con 11,42 mL de ácido acético glacial medido de forma aproximada en una probeta con 40 mL de agua Mili-Q. Este volumen se pasa a un vaso de precipitados y se va ajustando el pH adicionando  $\text{NH}_3$  gota a gota. Una vez el pH ha sido ajustado, la disolución se lleva a un matraz aforado, de plástico, de 100 mL donde se enrasa con agua Mili-Q.

- **Disolución Reguladora Acético/Acetato 3 M**

Se prepara la disolución con 17,19 mL de ácido acético glacial medido de forma aproximada en una probeta con 40 mL de agua Mili-Q. Este volumen se pasa a un vaso de precipitados y se va ajustando el pH adicionando  $\text{NH}_3$  gota a gota. Una vez el pH ha sido ajustado, la disolución se lleva a un matraz aforado, de plástico, de 100 mL donde se enrasa con agua Mili-Q.

- **Disolución de SAPH 20 mM**

Se pesan 0,4824 g de SAPH dentro de un vaso de precipitados previamente tarado en la balanza.

Una vez tenemos la masa deseada de SAPH en el vaso de precipitados, se le adiciona alrededor de 80 mL de etanol y se deja en agitación hasta que se haya disuelto por completo. El siguiente paso sería pasar el contenido del vaso de precipitados a un matraz aforado, de plástico, de 100 mL y enrasar con etanol.

- **Disolución Patrón intermedia de Aluminio  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$**

Se prepara un patrón intermedio por dilución de un patrón de  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de aluminio. En primer lugar, se ha preparado un patrón de  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  en un matraz de 25 mL pipeteando 1,5 mL, al que una vez enrasado se le añade 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  para evitar que el aluminio quede adherido a las paredes del matraz.

A partir de este patrón de  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  se ha preparado el patrón intermedio en un matraz de 25 mL pipeteando 1 mL.



## 7.2. Anexo 2

### Cálculo de incertidumbres para el proceso de validación

El cálculo de incertidumbres se ha realizado utilizando el método de Kragten. A continuación se muestran los cálculos realizados para la determinación de la incertidumbre y de la contribución de los distintos factores de la misma en el cálculo de la  $u_c$  para la preparación de la reguladora 0,9 M.

Partiendo de la ecuación del modelo:

$$C_{0,9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}} = C_{\text{Acético}} \cdot \left(\frac{V_{\text{Probeta}}}{V_{100}}\right) \cdot \left(\frac{V_{\text{micro}}}{V_{\text{Bote}}}\right)$$

Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	
$C_{\text{Acético}}$	$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6	0,0045	
$V_{\text{Probeta}}$	L	0,05	0,009	
$V_{100}$	L	0,1	0,001	
$V_{\text{micro}}$	L	$1,5\cdot 10^{-3}$	0,0027	
$V_{\text{Bote}}$	L	0,005	0,018	
$C_{0,9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>0,9</b>	<b><math>u_c</math></b>	<b>0,02</b>

Para realizar los cálculos se construye una matriz cuadrada donde en filas y columnas se expresan las variables que contribuyen a la incertidumbre.

	$C_{\text{Acético}}$	$V_{\text{Probeta}}$	$V_{100}$	$V_{\text{micro}}$	$V_{\text{Bote}}$
$C_{\text{Acético}}$	$6 + 0,03$	6	6	6	6
$V_{\text{Probeta}}$	0,05	$0,05 + 0,0005$	0,05	0,05	0,05
$V_{100}$	0,1	0,1	$0,1 + 0,0001$	0,1	0,1
$V_{\text{micro}}$	$1,5\cdot 10^{-3}$	$1,5\cdot 10^{-3}$	$1,5\cdot 10^{-3}$	$1,5\cdot 10^{-3} + 4,5\cdot 10^{-6}$	$1,5\cdot 10^{-3}$
$V_{\text{Bote}}$	0,005	0,005	0,005	0,005	$0,005 + 0,0001$
$C_{0,9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}}$	0,9045	0,909	0,899	0,9027	0,882
$u_s (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0,0045	0,009	0,001	0,0027	0,018

De esta manera tendríamos la incertidumbre estándar de cada fuente de variabilidad. A partir de la ley de propagación de la incertidumbre se calcula la incertidumbre combinada y una vez conocida ésta, se determina la incertidumbre expandida a partir de la ecuación 2.

### 7.3. Anexo 3

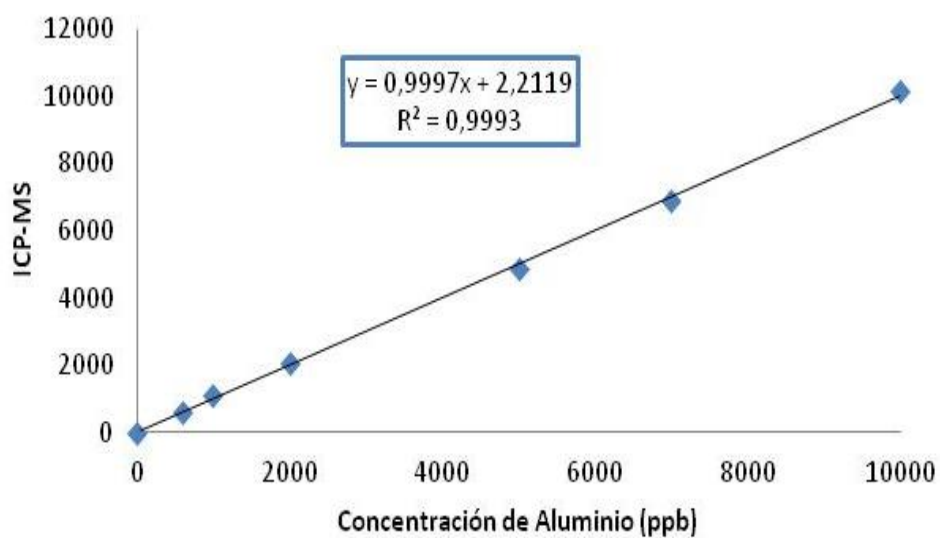
**Tabla Anexo 3. Muestras a preparar para el diseño de experimentos Box-Behnken.**

Experimento	pH	Volumen (mL)					Total
		Tampón	SAPH	Etanol	Muestra	Agua	
Blanco 1	5,7	1,5	0,625	1,15	0	1,725	5
Muestra 1	5,7	1,5	0,625	1,15	0,5	1,225	5
Blanco 2	5,7	2,25	0,75	1	0	1	5
Muestra 2	5,7	2,25	0,75	1	0,5	0,5	5
Blanco 3	5,7	1,5	0,75	0,25	0	2,5	5
Muestra 3	5,7	1,5	0,75	0,25	0,5	2	5
Blanco 4	6,7	0,75	0,625	1,15	0	2,475	5
Muestra 4	6,7	0,75	0,625	1,15	0,5	1,975	5
Blanco 5	4,7	1,5	0,75	1	0	1,75	5
Muestra 5	4,7	1,5	0,75	1	0,5	1,25	5
Blanco 6	5,7	1,5	0,5	0,5	0	2,5	5
Muestra 6	5,7	1,5	0,5	0,5	0,5	2	5
Blanco 7	5,7	1,5	0,625	1,15	0	1,725	5
Muestra 7	5,7	1,5	0,625	1,15	0,5	1,225	5
Blanco 8	5,7	2,25	0,625	1,85	0	0,275	5
Muestra 8	5,7	2,25	0,625	1,85	0,5	0,025	5,25
Blanco 9	4,7	2,25	0,625	1,15	0	0,975	5
Muestra 9	4,7	2,5	0,625	1,15	0,5	0,225	5
Blanco 10	4,7	0,75	0,625	1,15	0	2,475	5
Muestra 10	4,7	0,75	0,625	1,15	0,5	1,975	5
Blanco 11	6,7	1,5	0,5	1,25	0	1,75	5
Muestra 11	6,7	1,5	0,5	1,25	0,5	1,25	5
Blanco 12	4,7	1,5	0,625	1,85	0	1,025	5
Muestra 12	4,7	1,5	0,625	1,85	0,5	0,525	5
Blanco 13	5,7	1,5	0,5	2	0	1	5
Muestra 13	5,7	1,5	0,5	2	0,5	0,5	5
Blanco 14	5,7	0,75	0,5	1,25	0	2,5	5
Muestra 14	5,7	0,75	0,5	1,25	0,5	2	5
Blanco 15	6,7	1,5	0,75	1	0	1,75	5
Muestra 15	6,7	1,5	0,75	1	0,5	1,25	5

**Cont. Tabla Anexo 3. Muestras a preparar para el diseño de experimentos Box-Behnken.**

Experimento	pH	Volumen (mL)					
		Tampón	SAPH	Etanol	Muestra	Agua	Total
Blanco 16	4,7	1,5	0,5	1,25	0	1,75	5
Muestra 16	4,7	1,5	0,5	1,25	0,5	1,25	5
Blanco 17	5,7	0,75	0,75	1	0	2,5	5
Muestra 17	5,7	0,75	0,75	1	0,5	2	5
Blanco 18	6,7	1,5	0,625	1,85	0	1,025	5
Muestra 18	6,7	1,5	0,625	1,85	0,5	0,525	5
Blanco 19	4,7	1,5	0,625	0,375	0	2,5	5
Muestra 19	4,7	1,5	0,625	0,375	0,5	2	5
Blanco 20	5,7	1,5	0,625	1,15	0	1,725	5
Muestra 20	5,7	1,5	0,625	1,15	0,5	1,225	5
Blanco 21	5,7	0,75	0,625	0,375	0	3,25	5
Muestra 21	5,7	0,75	0,625	0,375	0,5	2,75	5
Blanco 22	5,7	1,5	0,75	1,75	0	1	5
Muestra 22	5,7	1,5	0,75	1,75	0,5	0,5	5
Blanco 23	5,7	2,25	0,5	1,25	0	1	5
Muestra 23	5,7	2,25	0,5	1,25	0,5	0,5	5
Blanco 24	6,7	2,25	0,625	1,15	0	0,975	5
Muestra 24	6,7	2,25	0,625	1,15	0,5	0,475	5
Blanco 25	5,7	0,75	0,625	1,85	0	1,775	5
Muestra 25	5,7	0,75	0,625	1,85	0,5	1,275	5
Blanco 26	6,7	1,5	0,625	0,375	0	2,5	5
Muestra 26	6,7	1,5	0,625	0,375	0,5	2	5
Blanco 27	5,7	2,25	0,625	0,375	0	1,75	5
Muestra 27	5,7	2,25	0,625	0,375	0,5	1,25	5

#### 7.4. Anexo 4



**Figura Anexo 4. Recta de calibrado obtenida por el ICP-MS.**